



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY
A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ**

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

**ANALÝZA KONFLUENCE ADHERENTNÍCH BUNĚK VE 2D
KULTUŘE**

ANALYSIS OF ADHERENT CELLS CONFLUENCY IN 2D CULTURE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Michaela Bracková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Larisa Baiazitova

BRNO 2017

Bakalářská práce

bakalářský studijní obor **Biomedicínská technika a bioinformatika**

Ústav biomedicínského inženýrství

Studentka: Michaela Bracková

ID: 173562

Ročník: 3

Akademický rok: 2016/17

NÁZEV TÉMATU:

Analýza konfluence adherentních buněk ve 2D kultuře

POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:

1) Proveďte literární rešerši v oblasti kultivace endoteliálních buněk. 2) Seznamte se s technikou fluorescenční a konfokální mikroskopie. Prostudujte mikroskopické techniky pro snímání adherentních buněk. 3) Proveďte kultivaci buněk v kultivačních jamkách s odlišnými podmínkami. 4) Proveďte sběr mikroskopických dat. Zhodnoťte přežívání buněk a dlouhodobou retenci v daných podmínkách. 5) Analyzujte konfluentnost vrstvy buněk v provedených experimentech. 6) Dosažené výsledky vhodně prezentujte a proveďte diskuzi.

DOPORUČENÁ LITERATURA:

[1] DEJANA, Elisabetta. Endothelial cell–cell junctions: happy together. Nature reviews Molecular cell biology, 2004, 5.4: 261-270.

[2] HUR, S. S., J. C. DEL ALAMO, J. S. PARK, et al. 2012. Roles of cell confluency and fluid shear in 3-dimensional intracellular forces in endothelial cells. Proceedings of the National Academy of Sciences. 109(28), 11110-11115.

Termín zadání: 6.2.2017

Termín odevzdání: 2.6.2017

Vedoucí práce: Larisa Baiazitova

Konzultant: Mgr. Josef Skopalík

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.
předseda oborové rady

UPOZORNĚNÍ:

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

ABSTRAKT

První část práce se zabývá teoretickým popisem adherentních buněk, především jejich stavbou a funkcemi. Dále je práce věnována popisu kultivace buněk, kde jsou zmíněny podmínky nutné pro kultivaci a látky, podporující růst buněk. Poslední část teoretické rešerše se zabývá mikroskopickou technikou, která je vhodná pro snímání endoteliálních buněk. Zejména se jedná o fluorescenční a konfokální mikroskopy.

Praktická část se zabývá kultivací adherentních buněk a zhodnocením provedených experimentů.

KLÍČOVÁ SLOVA

endoteliální buňky, adherentní buňky, fibroblasty, konfluence, kultivace, fluorescenční mikroskopie, konfokální mikroskopie, buněčné spojení

ABSTRACT

First part of this semester work dealing with the theoretical description of adherens cells, particularly structure and functions of this cells. Subsequently work is devoted to description of cell culturing, with mention of conditions which are necessary for cell culturing, following by substances which promote cell growth. Last part of theoretical research is concern with microscopy technique that is suitable for studying of adherent cells. Subsequently it is about fluorescence and confocal microscopes.

Practical part dealing with cell culturing of adherent cells and the evaluation of realized experiments.

KEYWORDS

endothelial cells, adherent cells, fibroblast, confluency, cell culture, fluorescence microscopy, confocal microscopy, cell junction

BRACKOVÁ, M. *Analýza konfluence adherentních buněk ve 2D kultuře*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2017. 42 s. Vedoucí semestrální práce Larisa Baiazitova.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svou semestrální práci na téma *Analýza konfluence adherentních buněk ve 2D kultuře* jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího semestrální práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené semestrální práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této semestrální práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a/nebo majetkových a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dne

.....

(podpis autora)

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu semestrální práce Larise Baiazitové za metodickou a odbornou pomoc, zejména za její trpělivost a další cenné rady při zpracování mé semestrální práce. Mé díky patří i konzultantovi Mgr. Josefu Skopalíkovi za odborný dohled a cenné poznámky.

V Brně dne

.....

(podpis autora)

OBSAH

Seznam obrázků	vi
Seznam zkratk	viii
Seznam příloh	viii
Úvod	1
1 Adherentní buňky	2
1.1 Endoteliální buňky	2
1.2 Konfluence u endoteliálních buněk	6
1.3 Embryonální buňky.....	6
1.4 Fibroblasty	7
2 Kultivace	10
2.1 Kultivační podmínky	10
2.2 Růstová křivka buněk	11
2.3 Želatina	12
2.4 Pasážování	12
3 Analýza buněčné konfluence	14
3.1 Automatická analýza konfluence	14
4 Fluorescenční mikroskop	16
4.1 Fluorescence	16
4.2 Fluorescenční barviva	17
4.3 Princip fluorescenčního mikroskopu	19
4.4 Stokesův posun	19
4.5 Konstrukce	21
5 Konfokální mikroskop	25
5.1 Princip	25
5.2 Technické detaily	27
5.3 Výhody.....	29
5.4 Nevýhody a omezení konfokálního mikroskopu	30

6	Praktická část	31
6.1	Seznam laboratorních pomůcek a přístrojů	31
6.2	Metodika přípravy tří typů buněk	31
6.3	Metodika nastavení kultivačních podmínek a jejich evaluace.....	32
6.4	Sběr dat	33
6.5	Realizace algoritmu pro vyhodnocení snímků.....	34
6.6	Výsledky	37
6.7	Diskuze	40
7	Závěr	42
	Literatura	43

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1.1: Endoteliální buňky v in vitro kultuře	2
Obrázek 1.2: Výskyt glykokalyxu (modré útvary) na povrchu endoteliální buňky	3
Obrázek 1.3: Těsné buněčné spojení	4
Obrázek 1.4: Embryonální buňky - HEK293	7
Obrázek 1.5: Morfologická struktura fibroblastů (vlevo) a fibrocytů (vpravo).....	8
Obrázek 2.1: Růstová křivka buněk.....	11
Obrázek 3.1: Automatická analýza konfluence buněk	14
Obrázek 3.2: Srovnání metod detekce hran, a) originální obrázek, b) metoda Prewitt, c) metoda Sobel.....	15
Obrázek 3.3: Segmentace detekcí hran – buňky, a) originální snímek, b) zpracovaný obraz	15
Obrázek 4.1: Struktura polovodičové nanočástice CdSe.....	18
Obrázek 4.2: Stokesův posun.....	19
Obrázek 4.3: Absorpční a emisní profil fluorescence.....	20
Obrázek 4.4: Konstrukce fluorescenčního mikroskopu.....	21
Obrázek 5.1: Konstrukce konfokálního mikroskopu	26
Obrázek 5.2: Optický řez v konfokální mikroskopii	26
Obrázek 5.3: Konfokální mikroskopie - skenování bod po bodu	26
Obrázek 5.4: Spektrofotometrický detektor - schéma (PMT - fotonásobič, S - štěrba)	27
Obrázek 5.5: Lasery používané v konfokální mikroskopii.....	28
Obrázek 5.6: Roviny optických řezů v konfokální mikroskopii.....	29
Obrázek 6.1: Schéma experimentu	32
Obrázek 6.2: Buněčná linie HEK293, světelný mikroskop, zvětšení 10x, polarizační objektiv	33
Obrázek 6.3: Schéma programu pro segmentaci detekcí hran.....	34
Obrázek 6.4: Schéma programu pro segmentaci prahováním	35
Obrázek 6.5: Fibroblasty, konfokální mikroskop, zvětšení 20x, suma získaných řezů před zpracováním (vlevo), segmentace detekcí hran (uprostřed), segmentace prahováním (vpravo).....	36
Obrázek 6.6: Schéma detekce počtu jader	36

Obrázek 6.7: HEK 293 - jádra, konfokální mikroskop, zvětšení 20x, detekce jader	36
Obrázek 6.8: Graf 1 - Konfluence fibroblastů, zvětšení 10X, želatina.....	38
Obrázek 6.9: Graf 2 - Konfluence fibroblastů, zvětšení 20X, želatina.....	39
Obrázek 6.10: Graf 3 - Konfluence HEK 293, zvětšení 20X, želatina.....	39
Obrázek 6.11: Graf 4 - Konfluence HEK 293, zvětšení 20X, konfokální miska	40

SEZNAM ZKRATEK

3D	Trojrozměrný, trojdimenzionální
CdSe	Selenid kadmnatý
CO ₂	Oxid uhličitý
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
FGF	Fibroblastový růstový faktor
HDF	Lidské kožní fibroblasty
HEK293	Lidské embryonální buňky z ledvin
HUVEC	Lidské endoteliální buňky z pupečnickové šňůry
HyD	Hybridními detektory
LDL	Nízkodenzitní lipoprotein
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NO	Oxid dusnatý
PBS	Fosfátový pufovaný fyziologický roztok
PDGF	Destičkový růstový faktor
PMT	Fotonásobič
RISC	Reduced Instruction Set Computing (snížená sada instrukcí)
RGB	Barevný model červená-zelená-modrá
RPM	Otáček za minutu
TGF-BETA	Transformující růstový faktor beta
TPA	Aktivátor plazminogen
TPAI	Inhibitor aktivátor plazminogen
UV	Ultrafialové záření
ZnS	Sulfid zinečnatý
ZO1	Protein pevného spojení, Zonula occludens-1

SEZNAM PŘÍLOH

BP_manual

konfluence.m

počet_bunek.m

data snímků (formát tiff)

ÚVOD

Spojení biologického a technologického výzkumu je pro dnešní medicínu a vývoj biotechnologických zařízení velmi podstatné. Výzkum a studium lidských buněk jsou význačné zejména pro vznik nových či umělých orgánů, a tím by nemocní nemuseli dlouho čekat na orgán od dárce.

Úkolem této práce je zkoumat konfluenci adherentních buněk. Růst buněk je sledován při různých podmínkách. V tom hrají roli zejména povrchy, ke kterým buňky při kultivaci přilnou a podmínky prostředí. Tyto povrchy a podmínky prostředí často stimulují růst buněk a cílem je zjistit, která metoda je tou nejvhodnější pro růst buněk. Součástí práce je i vytvoření programu pro zhodnocení získaných dat.

Teoretická část semestrální práce se zabývá tématy týkajícími se konfluencie. Nejdříve jsou popsány adherentní buňky, kde první část popisuje endoteliální buňky, jejich charakteristiku, vlastnosti a funkce. Po nich následuje teoretický text o fibroblastech a jejich vlastnostech. V práci je zmíněno, jak probíhá konfluencie a je zde i popis buněčných spojení, které při konfluenci vznikají. Díky těmto buněčným spojeníům mohou vznikat rozsáhlejší soubory a útvary buněk, z nichž se pak vytváří biologické struktury. Další část je věnována popisu kultivace a jak se provádí. Jsou zde zmíněny důležité zásady, které je nutné při kultivaci dodržovat. Součástí kultivace jsou i vhodně zvolené materiály, které by mohli zvyšovat a urychlovat růst buněk. Poslední částí teoretické rešerše je popis a seznámení se s mikroskopickými technologiemi. Jedná se o fluorescenční a konfokální mikroskopy, které jsou při výzkumu využity.

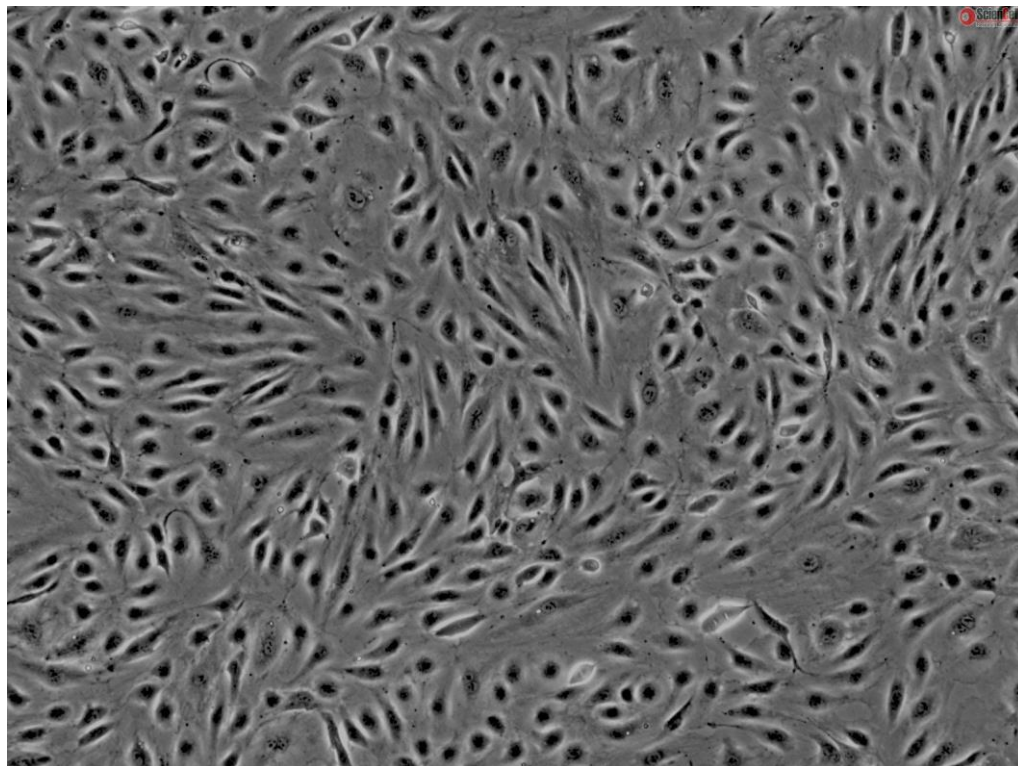
Praktická část obsahuje vlastní realizaci kultivace buněk. Jejich zdokumentování a následně vyhodnocení. Provádí se kultivace v několika odlišných podmínkách. Odlišné podmínky jsou dané především zvolenými povrchy a na každém povrchu dochází ke kultivaci buněčných kultur. Při dosažení dostatečné vysoké konfluentnosti v jamkách se provede několik pasáží. Ze získaných obrazových dat se provede analýza konfluencie pomocí programu sloužícího pro automatické vyhodnocení konfluencie ze sady snímků.

1 ADHERENTNÍ BUŇKY

1.1 Endoteliální buňky

Endoteliální buňky tvoří v lidském organismu jednovrstevnou výstelku cév. V těle se nachází mnoho orgánů, které se vyznačují různou stavbou, jinými funkcemi a účelem. Tím se liší i vlastnosti endoteliálních buněk v závislosti na daném orgánu. Mezi základní funkce endoteliálních buněk patří angiogeneze, semipermeabilita, diapedéza a odezvy na krevní průtok [1].

Endoteliální buňky jsou dlouhé v rozmezí 25-50 μm , široké 10-15 μm a jejich výška dosahuje okolo 5 μm . Charakterizuje je protáhlý tvar, který najdeme především u rovných částí cév, kde se také často vyznačují pravidelným uspořádáním. V těle jsou ale i místa, kde dochází k ohybu nebo k větvení cév. Zde jsou buňky polygonální a liší se i uspořádáním, které je nepravidelné. Buňky dokáží uvolňovat do mezibuněčného prostoru váčky. Jedná se o váčky extracelulární a vznikají při procesu exocytóza. Váčky mají tu vlastnost, že se podílejí na mezibuněčné komunikaci, jelikož ve svém nitru dokáží přenášet nukleové kyseliny i proteiny. Komunikace probíhá navázáním váčku na receptor nebo vnikem obsahu váčku do cytoplazmy jiné buňky. Další typy váčků se vyskytují na

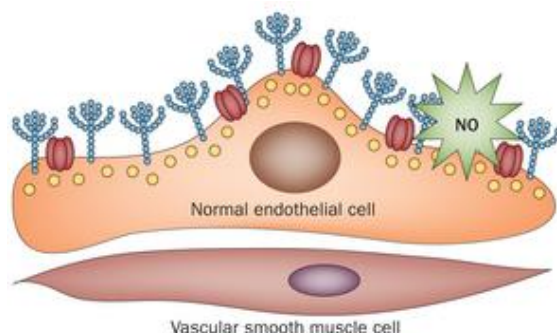


Obrázek 1.1: Endoteliální buňky v in vitro kultuře

[https://www.sciencellonline.com/media/catalog/product/cache/1/image/a6f8fb4f61eb724cff40f184d1fbcab0/8/0/8000_1.jpg]

stěnách buněk, kde vznikají endocytózou, přesněji se jedná o pinocytózu. Pomocí váčků na stěnách buněk vyčnívajících do mezibuněčného prostoru dochází ke vzájemným dotekům mezi buňkami, a tak se mezi nimi začínají vytvářet spojení. Tato spojení jsou ale méně pevná oproti spojení mezi epiteliálními buňkami. Je to dáno tím, že spojení u endoteliálních buněk nejsou uspořádané, spoje jsou často složité propojené a dochází k častým překryvům mezi buňkami [2][3][4].

Na lumenálním povrchu endoteliálních buněk můžeme najít vrstvu glykokalyxu (Obrázek 1.2), který zde funguje jako ochrana a mechanosenzor. V cytoskeletu mají bílkoviny aktin a myosin, jejichž pomocí se dokáží smrštít a ovlivňovat tak propustnost. Endotelové buňky jsou místem kam ústí signály z autonomních nervů nebo hormonálních podnětů z plazmy [5].



Obrázek 1.2: Výskyt glykokalyxu (modré útvary) na povrchu endoteliální buňky

[http://www.nature.com/nrneph/journal/v10/n3/images_article/nrneph.2013.275-f2.jpg]

Endoteliální buňky jsou podstatnou součástí krevních cév. Při proudění krve do cévní stěny dochází pomocí endoteliálních buněk k výběru procházejících látek jako jsou krevní bílkoviny a jiné buňky obsažené v krvi. Tento přenos je prostředkován transportními váčky pomocí transcelulárního systému po otevření buněčných spojů. Systém propouštějící tyto váčky musí být přísně hlídán. Vesikulární váčky totiž obsahují organely, které regulují rozpustné makromolekuly a ty pak mohou v cévách způsobit zvýšenou propustnost, zánět nebo trombotickou reakci. Různé funkce tedy ovlivňují endoteliální strukturu a ta následně ovlivňuje endoteliální reakci na krevní elementy nebo mění strukturu cévní stěny [1].

Tak jako různé funkce a vlastnosti dle druhu orgánu nebo tkáně, u kterého se buňky vyskytují, vznikají i různé typy spojení, které tyto buňky vytvářejí. Každé spojení je specifické svými komponentami a způsobem spojení k plnění určité funkce [1].

U endoteliálních buněk lze najít spojení, které je velmi podobné buněčnému spojení u epiteliálních buněk. Nachází se zejména u lymfatického systému nebo žil. Obsahují látky plakoglobin a desmoplakin, které jsou spojeny s vaskulárním kadherinem. Proč je právě toto spojení v lymfatickém systému se ještě nepodařilo zcela zjistit. Existují ale teorie, že by to mohlo mít určitou souvislost s krevním průtokem, na který by mohli lépe reagovat než jiná spojení [1].

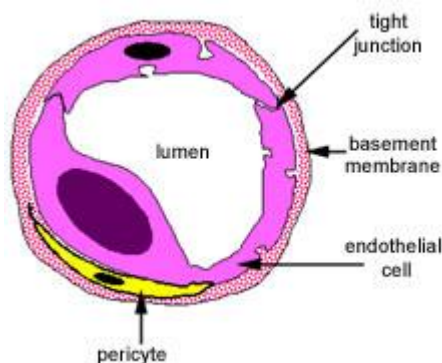
Dalšími typy spojení jsou adherentní a těsná. Oba typy najdeme v blízkosti mezibuněčné šterbiny. Tato spojení můžeme najít i u epiteliálních buněk, ale liší se tím, že obsahují desmozomy. Desmozomy jsou struktury nacházející se v buněčných

spojeních. Jsou tvořeny transmembránovými bílkovinami desmogleinem a desmogleinem. Následně jsou pak spojeny s plakoglobinem a desmoplakinem k intermediálním filamentům [1].

Adherentní a těsná spojení se od sebe liší zejména obsahem molekul. Vzhledem k tomu, že se tato spojení od sebe liší, lze najít i rysy, které mají společné. Typickým rysem pro obě spojení je pericelulární zip. Je to útvar, který se nachází podél membrány buňky a vzniká při homofilické interakci. Tato interakce je podmiňována transmembránovými proteiny. Endoteliální buňky dokáží exprese tyto transmembránové proteiny specifikovat. U adhezních spojení se jedná o kadherin a u pevného spojení dochází ke specifikaci kladinu. To, že tyto látky vykazují určitou specifičnost, by mohlo korelovat s tím, že hrají určitou roli v rozpoznávání procházejících buněk. Přičemž kontrola procházejících buněk přes bariéru, je jednou z hlavních funkcí endotelu. Jednoznačně se také podílejí na vlastnostech endoteliálních buněk [1].

Nově utvořený celek je připojen k aktinovým filamentům nacházejících se v cytoplazmě. K připojení dochází díky cytoplazmatickému ocasu, přes který se váže nejen k cytoskeletu, ale i k signálním proteinům. Tím je pak umožněn signální přenos mezi buňkami a uvnitř buňky. Toto spojení je důležité také pro regulaci spoje a to tak, že dochází k jeho otevření nebo uzavření. Navíc se také zjistilo, že by tato spojení mohla mít určitou souvislost s udržováním tvaru buňky a vznikem polarity u buněk a mezi buňkami [1].

Pevná spojení se u endoteliálních a epiteliálních buněk příliš neliší. Při tomto spojení dochází k utěsnění sousedních buněk. Utěsnění je provedeno díky obvodovému prstenci, který se nachází na vrcholu obou typů buněk. Tento těsný spoj je ale regulovatelný. Ovlivňují jej rozpuštěné látky a také iontový tok, který je vytvářen mezi spojenými buňkami, které spolu sousedí [1].



Obrázek 1.3: Těsné buněčné spojení

[<http://www.histology.leeds.ac.uk/circulatory/assets/capillary.jpg>]

Pro všechna spojení jsou velmi podstatnou složkou proteiny. Proteiny zde plní mnoho funkcí, jako je spojování, signalizace, regulace otevření spojení, schopnost vázat jiné látky. Další jejich významnou funkcí je to, že zde mohou pracovat jako adaptéry. V tom smyslu, že pokud dojde k uvolnění nebo průchodu některého proteinu či látky ze spojení, dokáží zachycenou látku přemístit do jádra, kde může dojít k její transkripci [1].

Existují teorie, že adherentní a těsná spojení jsou spolu vzájemně provázána. To by mohlo souviset s tím, že adherentní spojení ovlivňují strukturu pevných spojení. To je ale

ovšem také pouze ještě nepodložená teorie. Adherentní spojení jsou vytvářena v raných stádiích mezibuněčného kontaktu, následně až po nich vznikají spojení pevná. Studie poukazují na to, že v obou strukturách se nachází stejná komponenta. To by mohlo vysvětlovat to, proč jsou struktury pevných spojení ovlivňovány adherentními. Jedná se o komponentu ZO1. ZO1 je protein ve kterém dochází ke spojování určitých specifických proteinů, jako je okludin nebo klaudin. ZO1 najdeme u adherentních spojení pouze v časně fázi vývoje buněčného spojení. U pevných spojeních je najdeme až, pokud je spoj zcela utvořen a plně stabilizován. Dále se zjistilo, že v některých buněčných systémech vznikají blokovací adherentní spojení, která inhibují správné uspořádání pevných spojení [1].

Buněčná spojení se liší složením i morfologickými znaky. Tyto rozdíly jsou vidět podél délky vaskulárního stromu. Tento strom reaguje na požadavky propustnosti. Adherentní spojení najdeme ve všech typech cév. Těsná spojení najdeme spíše v částech, kde dochází k dynamickým změnám mezi krví a tkáněmi. To je typické pro kapilární žilky. Tomu je také přizpůsobena stavba a složení těsných spojení. Jedná se o velmi složitou strukturu, kde dochází k mechanismu propustnosti. Tím musí být pod určitou kontrolou podobným způsobem, jako to je u mozkové mikrocirkulace [1].

Vrstva endoteliálních buněk vytváří rozhraní mezi cévní soustavou a tkáněmi. Mezi zmíněnými prostory probíhá často výměna látek. Buňky mají schopnost selekce, hranicí tedy projdou jen potřebné látky, například pomocí aktivního transportu. Kromě výběru potřebných látek pro správnou funkci orgánů, jsou buňky schopny i regulovat či inhibovat tvorbu látek. Jednou z funkcí endoteliálních buněk je schopnost signalizace, kterou jsou schopny uskutečnit dvěma způsoby. Dokáží signalizovat přímo prostřednictvím proteinů nebo receptory růstového faktoru. Druhý způsob je nepřímý a děje se řetězovým způsobem se zachovanou podstatnou informací, kterou si jednotlivé struktury, účastníci se tohoto děje, předávají až k cílové buňce. Informace, kterou si buňky předávají je nazývána transkripční faktor [3][5][6].

Uplatňují se také při krvácení, kdy dokáží řídit procesy jako je trombolýza či adherence trombocytů, nebo produkují potřebné sloučeniny pro změny průtoku krve. Krevní průtok je ovlivněn vazokonstrikcí, pro kterou jsou nutné látky endotelin a angiotenzin. Opačným procesem je vazodilatace, kterou podporují prostacykliny a NO. Při hemokoagulaci dochází k shromažďování a syntéze protrombotických látek, jako jsou von Willebrandův faktor, tkáňový faktor, inhibitor aktivátor plazminogen (TPAI). Opět se jedná o látky, které jsou regulovány endoteliálními buňkami. Pokud ale bude cílem snížení srážlivosti krve, například k navrácení původnímu stavu po hemokoagulaci, bude docházet k produkci látek prostacyklinů, trombomodulinu, aktivátoru plazminogenu (TPA) a molekul podobných heparinu. Následně dojde k jejich syntéze a působení na patologický stav [3][5][6].

Udržují cévní napětí, usměrňují krevní průtok. Dokáží podněcovat k tvorbě hormonů. Podílí se na tvorbě nových buněk, zejména v hladkém svalstvu. Ke zvýšení růstu buněk jsou produkovanými stimuly dva faktory – destičkový růstový faktor (PDGF) a fibroblastový růstový faktor (FGF). Ke snížení růstu jsou určeny inhibitory heparin a TGF-BETA, který podněcuje buňky k apoptóze. Artérie mají ve své stěně lipoproteiny, které endoteliální buňky dokáží ovlivňovat. Jsou i součástí imunitního systému, kdy pomáhají při zánětlivých reakcích. V případě zánětu dochází ke dvěma vlivům. Jedno vliv je prozánětlivý. Endoteliální buňky vystaví pro leukocyty adhezivní molekuly

[3][5][6].

Pro transport a buněčné procesy je důležité prostředí, kde se mohou uskutečňovat. Endoteliální buňky dokáží jedno z těchto prostředí vytvořit, jedná se o extracelulární matrix. Ve svém blízkém prostředí udržují rovnováhu okolních soustav, které se podílejí na toku krve a zajišťují interakci mezi krví a tkáněmi [3][5][6].

1.2 Konfluence u endoteliálních buněk

K zachování celistvosti endotelu slouží buněčné spoje. Tyto buněčné spoje podporují adhezi buněk, ale slouží i k přenosu vnitrobuněčných signálů. Tyto signály jsou schopny vyvolat útlum růstu buněk, apoptózu, vznik nových cév nebo i zahájit genovou expresi. Mimo to se zjistilo, že tyto buněčné spoje mohou ovlivňovat svou molekulární strukturu s vnitrobuněčnými signály i bílkoviny, a tak se podílet na cévní homeostáze [1].

Dnes je možné nasimulovat téměř stejný fyziologický stav endoteliálních buněk, který se nachází u dospělých osob. Lze to metodou in vitro, kdy buňky musí dosáhnout konfluentního stavu. Jedná se o stav, kdy je celá plocha 100% pokryta endoteliálními buňkami in vitro. Buňky by se neměly překrývat ani by mezi nimi neměly být mezery. V tomto stavu jsou buňky inhibovány v růstu vzájemnými doteky a to je chrání před apoptózou. Inhibice růst buněk nezastaví, ale pouze zminimalizuje. Buňky se dále dělí a začínají zaplňovat veškeré volné místo kolem sebe. Buňky se vzájemně obklopují a nemají již žádný prostor pro nové dělení, následkem toho začne docházet k postupnému umírání buněk [1].

Při stavu, kdy endoteliální buňky nejsou konfluentní vykazují v in vitro kultuře podobné vlastnosti s fibroblasty nebo mesenchymálními buňkami. Jednak tvarem, kdy jsou protáhlé, ale i chováním. Jsou více pohyblivé a citlivé na stimulaci růstových faktorů. Jakmile dosáhnou konfluence a zároveň jejich buněčné spoje budou zcela vytvořené, přestanou být citlivé na růstové faktory. Tento stav se pak označuje jako klidový. Na udržování zmíněného stavu se podílejí junkční bílkoviny. Pokud ale dojde k poškození cév nebo mezibuněčných spojů nastane narušení klidového stavu. Buňky pak jsou znovu schopny reagovat na růstové faktory a přemísťují se do poškozeného místa [1].

Signální dráhy bývají aktivovány utvořením buněčných spojení. Po kontaktu mezi buňkami nastupují 2 odezvy. Odezvy jsou rychlé a krátké a jsou způsobeny junkčními proteiny. Slouží ke komunikaci a na základě nich se buňky dostanou do správné polohy. Jakmile je buněčný spoj správně uspořádán, přichází na řadu junkční bílkoviny, které slouží k přenášení signálů. Vyskytují se mezi nimi i signály, které podporují stabilitu buněčné vrstvy [1].

Inhibice buněčného růstu vzniká při přímém kontaktu sousedních buněk. V tomto procesu je přítomna látka kadherin, která inhibici podporuje. Důležitým faktem ohledně kadherinu je i to, že jeho snížená exprese je přítomna u lidí s rakovinou. Toto snížení je pak následováno zvýšeným nárůstem nádorových buněk [1].

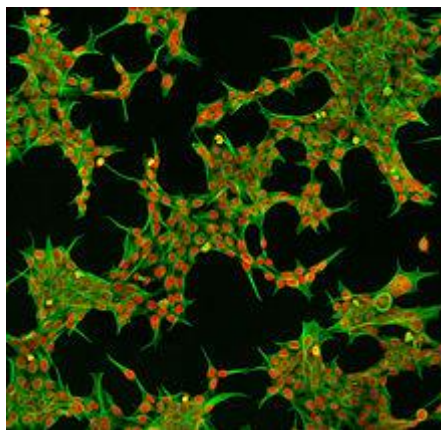
1.3 Embryonální buňky

Embryonální buňky řadíme mezi buňky kmenové, které jsou označovány jako primární.

Tyto kmenové buňky se dokážou přeměnit na jakýkoliv jiný typ buněk. Tedy to dokážou i buňky embryonální. Při růstu nových buněk, tak mohou vznikat buňky, které jsou zrovna pro tělo potřebné, například při poškození či opotřebením tkání či orgánů. Vznikají z nich krevní, svalové, kostní i nervové buňky a mnoho dalších [7][8].

Embryonální buňky jsou tak nazývány proto, že se jedná o buňky z embryonálního vývoje buněk ve stádiu moruly nebo blastocysty. Blastocysta je charakteristická tím, že je ve vývoji teprve několik dnů a obsahuje okolo 50-150 buněk. Při nastavení podmínek a podpůrných látek, jsou buňky schopny se přeměnit do každého typu buněk, které se vyskytují v lidském dospělém těle. Buňky jsou dokonce tak přizpůsobivé, že je možné poskytnout jinému živočišnému druhu a tam se buňky začnou sami vyvíjet a přizpůsobovat se prostředí [8]. Tyto buňky lze i dlouho skladovat, jelikož vykazují velmi dlouhou dobu životnosti bez ztráty jejich vlastností [9].

Buňky lze kultivovat v Petriho miskách či v jiných nádobách určených pro kultivaci. Tyto buňky rostou v misce až do té doby pokud ji celou nepokryjí. Po té jsou z misky odstraněny a rozděleny do několika dalších misek s novým a čerstvým médiem podporující růst. Tento proces se nazývá pasáž a probíhá po každém pokrytí misky. Buňky je možno rozdělit nebo zmrazit v kdykoliv, na stavu ani fázi vývoje nezáleží. Při další práci s nimi je jen nutné zkontrolovat jejich stav, a zdali jsou použitelné [9].



Obrázek 1.4: Embryonální buňky - HEK293

[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/6/6e/HEK_293.jpg/220px-HEK_293.jpg]

Vytvoření embryonálního kmene trvá nejméně půl roku a s touto délkou je nutno počítat i s několika pasážemi buněk. Uměle vytvořené buněčné linie pak musí splňovat dvě podmínky, které jsou určeny jako kritické. Jednou z nich je to, že buňky si během procesu kultivace a několika pasáží zachovaly schopnost přeměny do jakékoliv buňky vyskytující se v dospělém těle jedince. Další podmínkou je to, že nesmí obsahovat žádné genetické vady [9].

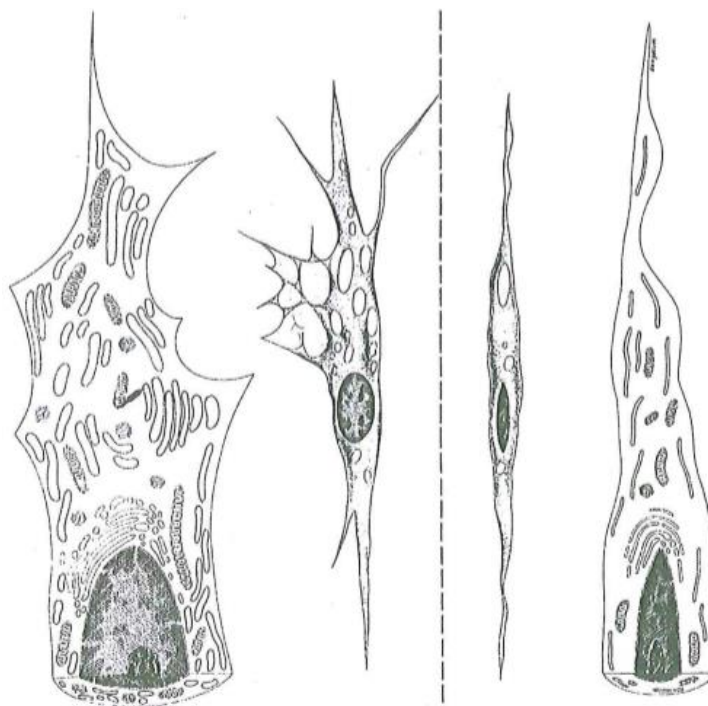
1.4 Fibroblasty

Fibroblasty se řadí mezi vazivové buňky. Jedná se o druh buněk, který se ve vazivových strukturách nachází nejčastěji. Fibroblasty mají schopnost vytvářet vlákna a amorfní látky [10].

Existují dva stavy, ve kterých se mohou fibroblasty vyskytovat. Jsou to stavy aktivní a klidové. Při pohledu na fibroblasty v rozdílných stavech lze vidět odlišnosti v jejich tvaru. Nejvíce k tomuto rozdílu dochází mezi fibroblasty, jejichž aktivita je synteticky vysoká oproti klidovým fibroblastům. Klidové fibroblasty vznikají při tvorbě matrix, kterou jsou fibroblasty schopny vytvořit. Klidové fibroblasty se pak v této matrix volně vyskytují. Aby se tyto buňky snadněji rozlišily, mají každá svůj název. Aktivním fibroblastům zůstává označení fibroblasty. Klidové fibroblasty se vyskytují v rámci histologie pod názvem fibrocyty [10].

Aktivní fibroblasty mají oproti klidným rozmanitější skturu a jsou větší (Obrázek 1.3). Obsahují více mitochondrií, tukových kapének. Vyskytuje se v nich velké množství endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu. Golgiho aparát je zde vyvinutý velmi dobře vyvinutý. Cytoplazma v aktivních fibroblastech různě rozvětvená dle sktury. Jádro ve fibroblastu je velké a má oválný tvar. Jeho jádro se velmi obtížně barví, jelikož obsahuje málo chromatinu. Součástí jádra je také nukleolem [10].

Fibroblast je schopný produkovat různá vlákna a různé mezibuněčné hmoty. Mezi vlákna, která je schopen vytvořit patří vlákna kolagenní, retikulární a elastická. Z mezibuněčných struktur vytváří látky, které jsou amorfni a dokáže také syntetizovat glykosaminoglykany a glykoproteiny [10].



Obrázek 1.5: Morfologická struktura fibroblastů (vlevo) a fibrocytů (vpravo)

[JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchôa, José CARNEIRO a Robert O. KELLEY. *Základy histologie*. Jinočany: H & H, 1997. ISBN 80-85787-37-7. S:102, Obr. 5-15]

Fibroblasty se ve vazivových tkáních rozmnožují dělením – mitózou. Toto dělení je nejvíce produktivní u dětí, během vývoje. Po ukončení vývoje, u dospělých dojde ke snížení jejich koprodukce. K mitóze fibroblastů dochází pouze v případě, kdy je pro organismus nutné vytvořit nové fibroblasty. To nastává v situaci, kdy dojde k poškození vaziva [10].

Tvar fibrocytů je spíše vřetenovitého tvaru a je menší. Fibrocyty s acidofilní cytoplazmou jsou na buněčné komponenty chudší než aktivní fibroblasty. Jeho jádro je také menší a má tmavší barvu. Fibrocyty se mohou dostat do aktivního stavu, a to zejména při hojení ran, kdy je potřebné zvýšit počet fibroblastů [10].

Fibroblasty se vyskytují v celém těle ve vazivové tkáni. Nejvíce v organismu produkují kolagen prvního a třetího typu. Při poranění vazivové tkáně dojde ke zvýšení produkce kolagenu ve fibroblastech. Produkce se nezvýší v celém organismu, ale pouze v místě poranění. Fibroblasty, které jsou v blízkosti poškození místa, se do něj začnou přemísťovat a také se množit. Všechna tato opatření jako migrace, množení a zvýšení produkce kolagenu, pomáhají zacelit ránu [11].

Při hojení ran mohou vznikat kromě nových aktivních fibroblastů, také myofibroblasty. Myofibroblasty jsou podobné fibroblastům a k tomu obsahují některé rysy, které jsou typické pro svalové buňky. Základ ve svalových buňkách je tvořen aktinovými a myozinovými mikrofilamenty. Oba typy těchto mikrofilament se objevují i v myofibroblastech. Jejich funkce je hlavně stahování (zmenšení, zacelení, uzavření) rány [10].

Vznik myofibroblastů z fibroblastů je podporován pomocí transformujícího růstového faktoru beta (TGFβ), který umožňuje právě přeměnu fibroblastu na myofibroblast. Některé fibroblasty by se mohli přeměnit i na ještě jiné typy či komponenty pojivové tkáně. Tyto přeměny jsou podmíněny zejména vlivy z okolí, a to například složením extracelulární matrix, tvarem buňky, hormony a růstovými hormony [11].

Bylo provedeno několik výzkumů, které naznačují, že fibroblasty z různých částí těla mohou být mezi sebou odlišné. Fibroblasty se považují za nejuniverzálnější buňky pojivové tkáně, jelikož se dokáží diferencovat do různých podtypů (viz myofibroblasty). Byly prováděny experimenty s kožními experimenty, kdy byly vytvořeny pro každý vzorek těchto fibroblastů stejné podmínky. Při kultivaci však nedocházelo ke stejným vývojem. Při dalším pokusu byl využit kostní matrix, jehož vhodně upravená část se implantovala do dermální vrstvy kůže. Tam docházelo k procesům, kdy došlo nejspíše k transformaci fibroblastu na buňky chrupavky. Dalšími experimenty došlo i k přeměně fibroblastů na kostní buňky. Následně vzniknul malý kus kosti [11].

2 KULTIVACE

Kultivace je biologická technika, která slouží k uchovávání, výzkumu či pěstování biologických útvarů, ze kterých se mohou vyvinout nové biologické struktury. Kultivovat se mohou živočišné i rostlinné buňky či tkáně, které se získají z objektu, který je potřeba zkoumat. Získaný vzorek je uchováván v laboratorních podmínkách [13]. Kultivace často probíhá in vitro, mimo organismus. Pod tím pojmem si lze představit to, že se jedná o kultivaci ve skle, přesněji spíše ve zkumavce [12][13].

2.1 Kultivační podmínky

Mezi základní kultivační podmínky patří sterilita, vhodný povrch pro kultivaci, kde uchováváme zkoumaný vzorek. Dalším podstatným aspektem je kultivační medium, které musí být co nejvíce podobné prostředí, ze kterého je vzorek odebrán. Velkou roli hraje i teplota a složení ovzduší [12].

Tato bakalářská práce se zabývá endoteliálními buňkami, embryonálními buňkami a fibroblasty, což jsou buňky adherentní. Jejich růst musí být tedy podpořen vhodným povrchem. Nejpoužívanějším povrchem pro adherentní buňky je hydrofilní polystyrén. Často to ale nestačí a povrch se vylepší jinou vhodnou látkou. V případě adhesních buněk by bylo vhodné přidat adhezní faktory jako je želatina, fibronectin, kolagen, poly-L-lysine nebo poly-D-lysine [12][14][15][16].

Teplota při kultivaci by se měla volit taková, aby byla co nejvíce podobná přirozenému prostředí, ze kterého je vzorek získán. Často kultivace probíhá při 37 °C [12][14].

Jednou z možností kde lze buňky uchovávat je inkubátor. Buňky se zde mohou kultivovat různě dlouhou dobu, od minut až po dny. A proto je nutné v inkubátorech zařídit, co nejvhodnější podmínky. Lze zde nastavit teplotu a mimo jiné i vhodnou atmosféru. Často dochází ke změnám koncentrace CO₂. Je důležité myslet na to, aby měli buňky vhodné podmínky pro růst, ale i na to, že je nutné zamezit kontaminaci [12][14].

Pro růst buněk je důležité médium. Jedná se o složku, která je pro vzorek vhodným prostředím a zároveň i živinami a kyslíkem. Obsahuje živiny, které podporují růst buněk. Složení musí být co nejvíce podobné oblasti, ze které je zkoumaný vzorek. Musí být totožné po chemické i fyzikální stránce. Základními složkami v mediu jsou anorganické soli, glukóza a pufrý. Často ale obsahují více látek, to ale závisí na zkoumaném materiálu a jeho požadavcích. Většinou se jedná o růstové faktory, bílkoviny, lipidy, vitaminy. Živné medium je nutno pravidelně měnit za čerstvé, zpravidla 2-3krát týdně [12][14].

Výběr vhodného média závisí na zkušenostech vědce a volí se zejména na základě složení zkoumaného vzorku nebo podle doporučení jiných badatelů či laboratoří. In vitro medium by mělo obsahovat složení, které dokáže simulovat tekutiny z přirozeného prostředí buněk. Medium je možno zakoupit hotové nebo připravit vlastní z polotovaru. U vlastní přípravy je ale nutno dbát na sterilní podmínky a uvědomit si, že použité složky mohou negativně ovlivnit růst buněk [12][14].

2.2 Růstová křivka buněk

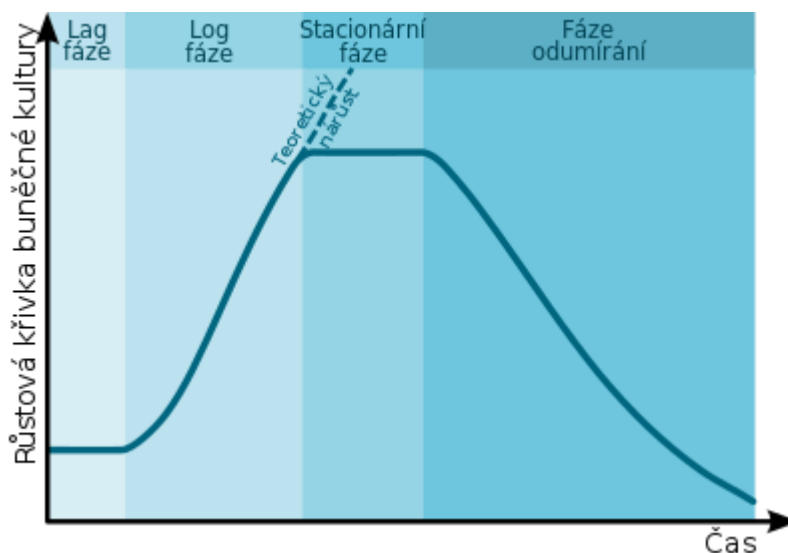
Růstová křivka buněk slouží k posouzení vzniku nových přídavků buněk nebo naopak i počtu úmrtí sledovaných buněk. Jedná se tedy o změny v množství buněk ve sledovaném časovém úseku. Křivka má 4 typické části. Tyto části se zabývají jednotlivými fázemi, které charakterizují růst zkoumaných buněk [12].

První fází je lag fáze. Buňky jsou převedeny do nového prostředí, kde dochází k jejich kultivaci. Touto změnou prostředí dochází právě k mírnému poklesu počtu buněk. Buňky se zde ale dokáží velmi rychle adaptovat, protože se vyskytují v mediu, které je velmi podobné jejich přirozenému prostředí. Po přizpůsobení se na nové prostředí dochází k nárůstu nových buněk a jejich přípravě na buněčné dělení [12].

Následuje log fáze, často také nazývaná jako logaritmická nebo exponenciální. Zde dochází poměrně k rapidnímu nárůstu nových buněk. Rostou exponenciální úměrou. V této fázi existuje největší možnost zachytit buňky v mitotickém dělení. Mitotický stav pak nabízí možnost chromozomového vyšetření [12].

Po nárůstu dochází následně k útlumu vzniku nových buněk, jedná se o stacionární fázi. Často to je způsobeno inhibičními faktory, jako je produkce růstových inhibitorů nebo vzájemnými kontakty mezi buňkami. Příčinou zastavení růstu je i nedostatek živin ze živného média a také nakupení toxinů a metabolitů [12].

V poslední fázi dochází k úmrtí buněk, čili k jejich úbytku. Je to tedy fáze úbytku buněk. Buňky se zde nemnoží z více důvodů. Nejsou již schopny čerpat živiny z živného média, jelikož v němž všechny potřebné látky již došly. Buňky tvoří ve větší míře toxiny a metabolické odpady. Mění se i jejich pH, které nepodporuje jejich nárůst. V této části je nutné část buněk převést do nového prostředí a tam pokračovat v jejich v růstu [12].



Obrázek 2.1: Růstová křivka buněk

[http://www.wikiskripta.eu/images/thumb/5/58/Bacterial_growth_cs.svg/400px-Bacterial_growth_cs.svg.png]

2.3 Želatina

Želatina je z chemického hlediska kolagenem, tedy bílkovinou. Jedná se o látku, která je lehce stravitelná a obsahuje 18 aminokyselin, neobsahuje akorát tryptofan. Želatina je vyráběna především z hovězí nebo vepřové kůže a také z kostí, méně již z pojiv a vaziv. Hlavní prostředky pro výrobu želatiny se získají buď hydrolýzou, nebo alkalicky [17].

Želatina je v biologii a biomedicínských oborech důležitou složkou, která je využívána zejména pro práci s buňkami. Vhodná je pro kultivaci buněk. Používá se jako vhodný povrch pro buněčnou kultivaci, umožňuje lepší přilnutí buněk. Výhodná je ke stabilizaci některých složek DNA nebo i jako blokátor některých činidel. V imunochémii je součástí některých médií, která rozlišují bakteriální druhy [18].

Želatina, která je suchá při pokojové teplotě, se nemění jak strukturou, tak vlastnostmi. Při vložení suché želatiny do horké vody začne bobtnat a vytvoří se želé. Rozpustná je v teplé vodě. V organických rozpouštědlech jako je alkohol, chloroform, benzen nebo olej je nerozpustná [18].

2.4 Pasážování

Pasáž buněk provádíme, pokud jsou buňky konfluentní ze 70-85%. K tomuto úkonu potřebujeme činidla Trypsin-EDTA 0,05% (Gibco), PBS (Sigma-Aldrich). Často se volí taková, jaká jsou doporučována v protokolu dodavatele buněk. Množství objemu trypsinu potřebného pro pasáž se volí dle velikosti kultivační nádoby [19].

Činidla trypsin, PBS, medium a jiné necháme rozmrazit na pokojovou teplotu. A připravíme si novou kultivační nádobu či jamku. Z nakultivované jamky, kde máme vysokou konfluentnost buněk, odsajeme medium. Tento krok je nutný z toho důvodu, že medium obsahuje bílkoviny a vápník. Pokud bychom k médiu přidali trypsin, došlo by k jeho neutralizaci a to je pro pasáž nežádoucí. Po aspiraci media buňky propláchneme PBS a odsajeme také. Do čisté jamky aplikujeme malé množství trypsinu tak, aby došlo k pokrytí povrchu jamky [19].

Trypsin je enzym, který při 37°C štěpí proteiny na povrchu buněk, včetně proteinů participujících na adhezi buňky k podložce. Subkonfluentní buňky by se tak pomocí trypsinu měly začít odlepovat od povrchu jamky. Takto připravenou jamku umístíme do inkubátoru na dobu 3-5 minut, kde je tedy nutné mít hodnotu teploty na 37 °C. Během této doby několikrát zkontrolujeme stav buněk pod mikroskopem, abychom se ujistili, že dochází k odchlípení buněk od dna. Trypsinizaci necháme probíhat zhruba do té doby, dokud nebude odlepeno přibližně 90 % buněk. Odlepené buňky zkontrolujeme tak, že kultivační nádobu vezme do dlaně a klepneme ji proti dlani. Tak by mělo dojít k deadherenci buněk, buňky mění svůj tvar na téměř kulatý a stávají se volně plovoucí v tekutině. Zkontrolujeme pod mikroskopem. Pokud k deadherenci nutného množství nedojde, necháme probíhat trypsinizaci dalších 30 sekund a poté zkontrolujeme stejným způsobem. Takhle budeme pokračovat, dokud nenastane k odlepení 90% buněk, ale maximálně 5 minut. K tomuto případu lze dojít, pokud trypsin není dostatečně zahřán nebo je utlumena jeho aktivita. Lze to napravit tak, že lze re-trypsinizovat přidáním čerstvého a teplého trypsinu. Další možností je propláchnout trypsin roztokem, který jej neutralizuje a doplnit jamku médiem. Tato možnost se používá, pokud zrovna není k

dispozici čerstvý trypsin a nezískáme jej rychle do 5 minut [19].

Po odlepení buněk je převedeme do ependorfky a vložíme na 5 minut do centrifugy. Získáme tak pouze rozdělené buňky od roztoku. Z ependofky odsajeme supernatan, aby v ní zbyly pouze buňky s co nejmenší příměsí trypsinu. Zbylé buňky zředíme médiem s růstovými faktory. Přidáme do jamek, kde chceme nechat růst novou subkulturu. Zbylý objem buněk s médiem, je pak vhodné využít na výpočet životaschopnosti buněk. Buňky obarvíme trypanovou modří a nanese na Burkerovu komůrku. Spočteme pod mikroskopem [19].

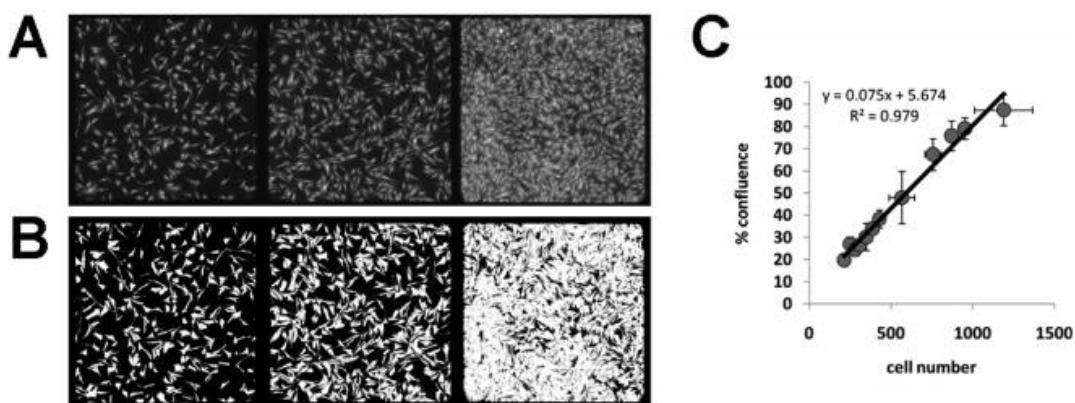
3 ANALÝZA BUNĚČNÉ KONFLUENCE

Využití buněk v medicínském a biomedicínském odvětví se stále rozšiřuje. Své uplatnění nachází zejména v produkci umělých orgánů nebo možnosti uzdravení poškozené tkáně. K zajištění správnému růstu buněk a hodnocení konfluence dané buněčné vrstvy existuje mnoho metod a přístupů [20].

3.1 Automatická analýza konfluence

Automatická metoda analýzy poskytuje hodnoty buněčné konfluence spojenou s počtem buněk. Může být využita pro analýzu 2D a 3D buněčných kultur [20].

Při analýze 2D buněčné kultury se zkoumá monovrstva buněk přilnutých k povrchu sklíčka kultivační nádoby. Na obrázku 2.2-A lze vidět 2D monovrstvu HDF (lidské kožní fibroblasty) buněk, které jsou fluorescenčně označeny. Buňky jsou nasazeny do 3 jamek v různém množství. Každá jamka je samostatně zdokumentována a segmentována ručně nastavitelným prahem. Rozlišení jader od zbytku okolí je dáno intenzitou fluorescence, kterou buňky poskytují. Výsledek segmentace lze vidět na obrázku 2.2-B. Oblast pokryta buňkami je změřena a představuje hodnotu konfluence. Konfluence je následně porovnávána s celkovým počtem buněk z dané jamky. Dle obrázku 2.2-C lze vidět, že konfluence s počtem buněk vykazují lineární vztah [20].



Obrázek 3.1: Automatická analýza konfluence buněk

[BARADEZ, Marc-Olivier a Damian MARSHALL. *The Use of Multidimensional Image-Based Analysis to Accurately Monitor Cell Growth in 3D Bioreactor Culture*, Fig. 2]

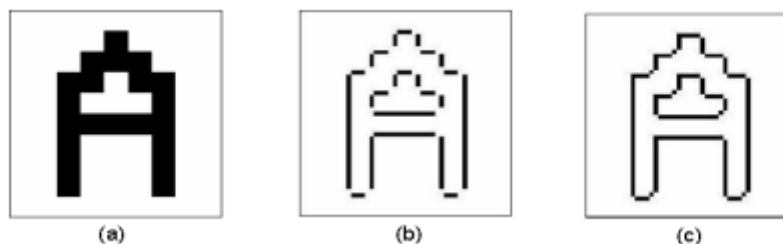
Buněčnou 2D vrstvu lze analyzovat více způsoby. Dalším rozšířeným způsobem je segmentace obrazu detekcí hran [21].

Buňky jsou nasazené v jamkách a provede se jejich zdokumentování, a poté dojde k jejich samostatnému zpracování. Zde dochází k segmentaci detekcí hran, jedná se o přechod mezi různými šedými tóny (náhlé změny jasu). Detekce pomocí hran se skládá ze 3 kroků – z filtrace (odstranění nežádoucího šumu), diferenciace (náhlé změny intenzity sousedních hodnot jsou zdůrazněny), hranový detektor (detekce míst s největší změnou intenzity) [21].

Pro detekci hran se nejčastěji používají 3 metody, jedná o metodu Prewitt, Sobel a Roberts. Jedná se o operátory 1. derivace [21].

Metoda Prewitt odhaduje hodnoty velikosti a orientace hran. Výpočet diferenciálního gradientu je časově velmi náročný. K výpočtu je využito více pixelů, kdy se odhaduje hodnota v okruhu 3x3 v 8 směrech [21].

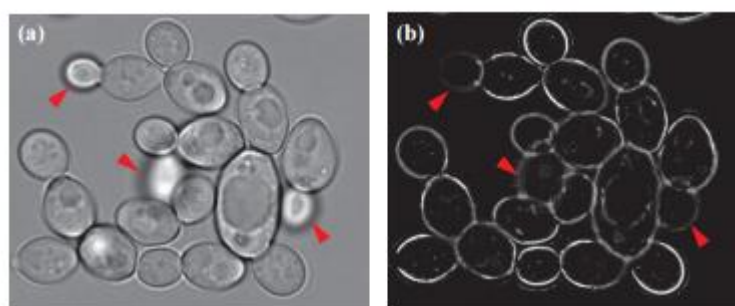
U metody Sobel dochází určení prostorového gradientu. Oblasti s vysokým výskytem intenzit jsou více zvýrazněny. Operátor se skládá ze dvojice konvolučních masek o rozměrech 3x3 [21].



Obrázek 3.2: Srovnání metod detekce hran, a) originální obrázek, b) metoda Prewitt, c) metoda Sobel

[https://www.researchgate.net/profile/Reghunadhan_Rajesh/publication/228349759_Edge_Detection_Techniques_for_Image_Segmentation_-_A_Survey_of_Soft_Computing_Approaches/links/0912f50a60060decac000000.pdf;fig5]

Metody tedy dokáží oddělit od sebe objekty od okolí na základě velikosti změny intenzity mezi objektem a okolím. Metody pracují s šedotónovým obrazem. Při použití této metody docílíme rozlišení buněk od okolí a tak lze následně získat hodnotu konfluence (procento plochy, které tvoří buněčnou vrstvu oproti okolí).



Obrázek 3.3: Segmentace detekcí hran – buňky, a) originální snímek, b) zpracovaný obraz

[https://hci.iwr.uni-heidelberg.de/sites/default/files/publications/files/146048136/zhang_14_cell.pdf;fig.2]

4 FLUORESCENČNÍ MIKROSKOP

Stavebním kamenem ve fluorescenční mikroskopii je schopnost některých vzorků, ať už organických či anorganických, absorbovat a následně vyzařovat světlo. Jedná se o fyzikální jevy nazývané fluorescence a fosforescence. Celý tento fyzikální děj probíhá velmi rychle. Při fluorescenci po absorpci excitačního světla dochází téměř k souběžné emisi světla, jelikož mezi absorpcí fotonu a následnou emisí je velmi krátká časová prodleva. Pokud po odstranění excitačního záření přetrvává emise delší časový úsek, jedná se o fosforescenci [22].

Prvním, kdo popsal jev fluorescence, je britský vědec Sir George G. Stokes v roce 1852. K tomu mu dopomohl experiment, při kterém aplikoval na minerální "kazivec" ultrafialové světlo. Při tom zpozoroval, že tato látka po ozáření emituje červené světlo. Dále zjistil, že emitované světlo má vždycky delší vlnovou délku než excitační světlo. Následné výzkumy v 19. století prokázaly u mnoha látek možnost fluorescence. Tu vykazují různé minerály, krystaly, chlorofyl, pryskyřice, vitamíny, anorganické sloučeniny, dokonce i různé bakterie a patogeny a třeba i máslo. A tím byly položeny základy pro fluorescenční mikroskopii [22].

Technika fluorescenční mikroskopie se stala nezbytnou součástí zejména v biologii a v biomedicínských vědách. Fluorescenční mikroskop se řadí mezi světelné mikroskopy a jeho podstata spočívá v zobrazení a detekci fluoreskujících substancí v buněčných strukturách. Princip je založen na jevu fluorescence zmíněného již výše, kdy za pomoci chemických látek, které jsou schopny po dopadu světla o kratší vlnové délce, vyzářit množství světla s delší vlnovou délkou. Následně tak dojde ke změně barev. Látky, které mají tuto vlastnost, nazýváme fluorochromy [22][23].

Fluorescenční mikroskop dokáže díky technice značení přes fluorescenční sondy identifikovat samostatnou molekulu nebo i několik cílových molekul současně. Přesto, že fluorescenční mikroskop nedokáže poskytnout prostorou rozlišovací schopnost pod difrakčním limitem (cca jedna polovina vlnové délky světla, kterou pozorujeme objekt [24]), dokáže pod těmito limity detekovat fluoreskující molekuly [22].

4.1 Fluorescence

Pro princip fluorescence jsou důležité látky, které jsou schopné vyzařovat viditelné světlo, jestliže byly ozářeny excitačním světlem, které mělo kratší vlnovou délku. K tomuto jevu ve fluorescenční mikroskopii bývají ozařovány vzorky s fluorochromy specifickými vlnovými délkami v rozmezí ultrafialového záření a vlnových délek v oblasti infračerveného a viditelného záření na hranicích s UV zářením. Takto ozářené látky pak emitují světlo o určité intenzitě a dostatečné kvalitě [22][23].

Existují také látky, které jsou schopny vykazovat fluorescenci bez přítomnosti fluorochromů, tento jev je označován jako autofluorescence. Ve vědě jsou ale stále více upřednostňovány fluorochromy, jelikož vzorky vykazující autofluorescenci se hůře pozorují, studie jsou složitější a vyzařují slabé či málo specifické záření [22].

4.2 Fluorescenční barviva

Fluorescenci mohou vykazovat látky s aromatickým jádrem, nebo i aminokyseliny, zejména tryptofan, který se řadí mezi esenciální aminokyseliny. Pokud ale zkoumaný vzorek nemá schopnost fluorescence, tak je možné do něj přidat speciální fluorescenční barviva. Tato barviva musí být schopna interagovat s buněčnými částmi. Pokud to barviva nesplňují, tak je tu možnost navázat barvivo na protilátku, která se váže k některé z bílkovin vyskytujících se ve sledovaném buněčném materiálu, cytoplazmě. Takto můžeme cíleně zobrazit třeba jen některé části z buněk, například cytoskelet, chromatin nebo bílkoviny v membráně [23].

Existuje mnoho druhů fluoroforů, které mají různé vlastnosti a funkce. V závislosti na tom, co chceme změřit či zjistit, se musí vybrat vhodné fluorofory. K měření pH se tedy musí použít fluorescenční sondy, které jsou citlivé na pH. Ke zjišťování vlastností ve tkáni, která vykazuje schopnost autofluorescence s krátkými vlnovými délkami, jsou zase vhodné fluorofory s dostatečně dlouhými excitačními a emisními vlnovými délkami. Fluorofory lze rozdělit do dvou tříd. Jednou ze tříd jsou vnitřní fluorofory a lze je najít v přírodě, jedná se často o aminokyseliny, NADH, flaviny, deriváty, hemoglobin, myoglobin a chlorofyl. Druhá třída jsou vnější fluorofory, které se přidávají ke vzorkům, které fluorescenci nevykazují nebo je jejich fluorescence velmi slabá a nemá vhodné vlastnosti. Do této třídy se řadí dansyl, fluorescein, rhodamin a spousta dalších. V experimentech a vědě je dnes dávana přednost spíše vnějším fluoroforům a ty může rozdělit ještě na dvě skupiny dle způsobu vazby k pozorovanému vzorku. Pokud se fluorofor naváže na látku kovalentně, jedná se o fluorescenční značky. V případě vazby nekovalentní se jedná o fluorescenční sondy [25].

Významnými zástupci z řad fluorescenčních proteinů jsou tryptofan, tyrozin a fenylalanin. Velmi vysoká absorpce UV záření a emise je typická pro tryptofan, který obsahuje indolovou skupinu zajišťující proces fluorescence. Podobně vysokou absorpci vykazuje i tyrozin, ten ale obsahuje jinou skupinu – fenolovou. Rozdílná jsou emisní spektra u těchto dvou proteinů, liší se svou šířkou, která je ovlivněna právě skupinami, které jsou navázány na protein. Širší emisní spektrum je u tryptofanu a doba životnosti jeho indolových zbytků je v rozmezí 1 až 6 ns. Pro pozorování změn u bílkovin je nejvhodnější použití tryptofanu, jelikož jeho fluorescence je závislá na změny pobíhající v jeho blízkosti. Absorpční spektra proteinů se vyskytují v rozmezí 250 – 300 nm, jejich emisní spektra se pohybují ve vlnových délkách od 280 do 350 nm. Kvantové výtěžky jsou pro tryptofan a tyrozin jen velmi málo odlišné, stejně tak není velký rozdíl v jejich době životnosti, kde se liší zhruba o 0,5 ns [25].

Vyšší absorpční a emisní spektra se vyskytují u enzymových kofaktorů například u NADH, které má excitační spektrum okolo hodnoty 340 nm a emisní spektrum okolo hodnoty 460 nm. Flaviny mají ještě vyšší spektra, kdy absorbují okolo 450 nm a emitují okolo 525 nm [25].

Ze skupiny vnějších fluoroforů byl zmíněn dansyl chlorid, který dokáže excitovat při 350 nm a emitovat zhruba při 520 nm. Jelikož při jeho navázání dochází k tvorbě kovalentních vazeb s volnými aminokyselinami proteinů, jedná se o fluorescenční značku. Dansyl se používá hlavně při měření polarizace, jeho spektrum je totiž citlivé na polaritu v jeho okolí. Jeho životnost dosahuje až 10 ns [25].

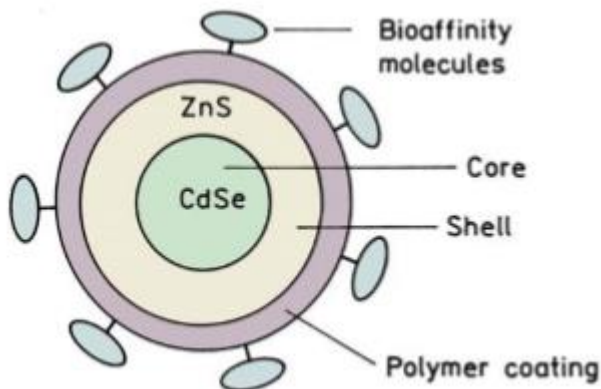
Fluoresceiny a rhodaminy se využívají také jako fluorescenční značky, ale obě tyto

látky nejsou citlivé na polaritu z okolí na rozdíl od dansylu. Jejich maximální hodnoty u absorpčního spektra se vyskytují v hodnotách 480 nm pro fluorescein a 600 nm pro rhodamin. Rozmezí emisního spektra vykazuje vlnové délky od 510 do 615 nm. Využití těchto látek je výhodné zejména pro medicínu, kde poslouží k detekci protilátek. Jejich výhody spočívají v jejich dlouhých vlnových délkách pro absorpci a emisi, které zajišťují minimální vliv z biologických struktur v okolí vzorku na pozadí. Doba života těchto barviv je okolo 4 ns [25].

Důležitým parametrem, kromě maximálních vlnových délek absorpce a emise, době životnosti, je také fotostabilita jednotlivých fluoroforů. Při dlouhodobém pozorování vzorku pod kontinuálním osvětlením s vysokou intenzitou dochází k blednutí fluoroforů (tzv. photobleached). Nejméně fotostabilním fluorem je fluorescein. V některých případech lze fotostabilitu zvýšit odstraněním kyslíku [25].

V postupující době a s nároky na lepší vlastnosti je snaha vyrábět nové a lepší produkty. Nároky jsou zejména na prodloužení doby životnosti jednotlivých fluoroforů a minimalizace blednutí. Došlo tedy k rozvoji nových tzv. luminoforů. Většina z nich je anorganických a mají poměrně dlouhou dobu životnosti. Do této skupiny se řadí polovodičové nanočástice, lantanidy a některé přechodné kovy s ligandovými komplexy [25].

Polovodičové nanočástice často obsahují jako hlavní komponentu kadmium selenid, které mají průměr v rozmezí 3 – 6 nm a dokáží poskytnout dostatečnou fluorescenci. Hlavní částice může být označena jako jádro, které je umístěno v obalu. Tento obal v případě jádra CdSe je tvořen látkou sulfidem zinečnatým. Rozsah vlnových délek je dán velikostí těchto polovodičových nanočástic [25].



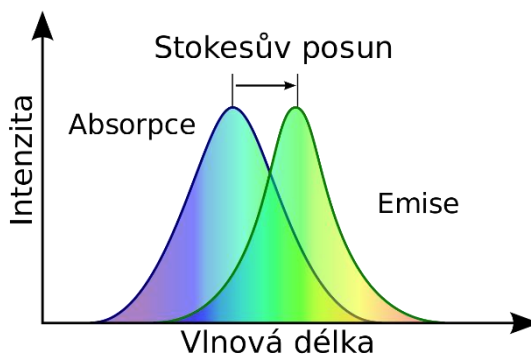
Obrázek 4.1: Struktura polovodičové nanočástice CdSe

[LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, c2006. ISBN 978-0387-31278-1. Figure 20.3]

V dřívějším vývoji nebyly polovodičové částice příliš fotostabilní ani chemicky stabilní. Tuto stabilitu jim při pozdějším vývoji zajistil obal okolo jádra. Aby byla zajištěna stabilita, musel materiál, který je v okolo jádra, splňovat podmínku, kdy ZnS musí mít větší energii při absorpci [25].

4.3 Princip fluorescenčního mikroskopu

Principem mikroskopu je tedy nutnost vytvořit dostatečně velké záření, které dokáže vzorek excitovat. Látky, které absorbují světlo o určité vlnové délce za velmi krátkou dobu (v řádech nanosekund), pak část záření emitují. Emitované světlo má oproti absorbovanému světlu delší vlnovou délku. Jeho energie je nižší a vyzařuje jinou barvu, než kterou bylo ozářeno. Tímto procesem dojde k posunu. Jedná se o Stokesův posun, který vyjadřuje ztrátu energie. Ke ztrátám energie dochází jinými procesy, ke kterým při reakci také dochází. Doprovodným jevem při emisi je zejména uvolňování tepla [26].



Obrázek 4.2: Stokesův posun

[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/9c/Stokes-Verschiebung_Cs.svg/1280px-Stokes-Verschiebung_Cs.svg.png]

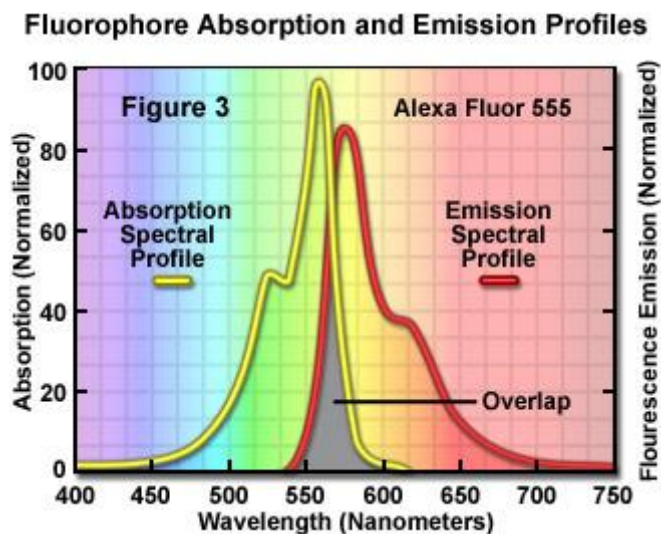
Detektorem pozorovaného objektu je lidské oko, které si vzorek prohlíží přes okuláry [27]. Pokud je mikroskop správně nastaven, tak by se do oka nebo na detektor mělo dostat právě jenom emisní světlo, které zobrazuje výsledné fluorescenční struktury s vysokým kontrastem oproti velmi tmavému až černému pozadí [22]. Často je k mikroskopu připojena i kamera, která je schopna vytvářet a ukládat snímky [27]. Obraz, který dopadá na detektor je pouze fluorescence vytvořená emisí z pozorovaného materiálu. Obraz vzniká na pozadí tvořené černou barvou, vzniklý obraz je pak díky tomu dostatečně kontrastní [28].

4.4 Stokesův posun

Během procesu fluorescence dochází k excitaci elektronů. Při jejich excitaci vzniká vibrační energie, která odeznívá, jakmile se elektrony vrátí zpět do základního stavu z procesu excitace. Tento děj skončí dříve než celý proces fluorescence. Ztrátou této vibrační energie dojde tedy k posunutí emisního spektra ozářeného fluorochromu. Spektrum je obvykle posunuto na delší vlnové délky oproti absorpčnímu či excitačnímu spektru. Čím vyšší jsou hodnoty Stokesova posunu, tím lze snáze odlišit excitační světlo od emisního. Tyto hodnoty zvýšíme vhodnou kombinací fluorescenčních filtrů [22].

Emisní maximum intenzity fluorescence fluorochromu je nižší jak ve vlnové délce, tak i ve velikosti oproti maximu excitační intenzity. Přesto je emisní maximum intenzity důležité pro získání profilu emisního spektra, které je velmi blízké nebo téměř i totožné s budící křivkou. Tato křivka vymezuje oblast, kde se dosahuje maximální intenzity fluorescence. Tato křivka je pro každý fluorofor charakteristická. K získání maximální

intenzity fluorescence, jsou fluorofory excitovány vlnovými délkami, které se nachází v blízkosti vrcholu budící křivky [22].



Obrázek 4.3: Absorpční a emisní profil fluorescence

[<https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/introduction-to-fluorescence-microscopy>]

Z okolí vrcholu emisního spektrálního profilu si lze pak zvolit úsek vlnových délek, které poslouží k fluorescenci vzorku. Tento výběr však může být ovlivněn řadou různých parametrů. Mezi ně se řadí spektrální odezva optického systému mikroskopu. Tato odezva je závislá na účinnosti přenosu světla přes sklo, na počtu čočkových a zrcadlových komponent. Musí se brát v úvahu také filtry, které se při mikroskopování používají [22].

Ve fluorescenční mikroskopii slouží k efektivnímu oddělení a detekci excitační vlnové délky od emisní filtry a hlavně jejich správný výběr. Filtry mají tu schopnost, že buď blokují, nebo propouští určité pásmo vlnových délek v oblasti ultrafialového, viditelného a blízkého infračerveného spektra. Fluorescenční vertikální osvětlovače slouží ke kontrole excitačního světla. Kontrola je prováděna prostřednictvím vyměnitelných filtrů, které se vkládají do dráhy světla, šířícího se směrem k preparátu. Dále je vložen filtr do dráhy světla, které se šíří od vzorku do okuláru nebo do detekčního kamerového systému [22].

Velmi důležitým kritériem, které je zaměřeno na relativně nízkou emisní intenzitu fluorescence, je nastavení dostatečně vysokého jasu zdroje světla. Slabou emisí světla, lze pak díky dostatečnému jasů zdroje světla maximalizovat a fluorochromy pak poskytují odpovídající absorpční vlastnosti [22].

Různé fluorofory absorbují fotony excitačního světla s různou účinností. Jedná se o funkci molekulového průřezu. Pravděpodobnost takové absorpce u konkrétních fluoroforů se vyjadřuje jako extinkční koeficient. Jestliže fluorofor má vysoký extinkční koeficient, znamená to, že pravděpodobnost absorpce fotonu v určitém pásmu vlnových délek, je větší [22].

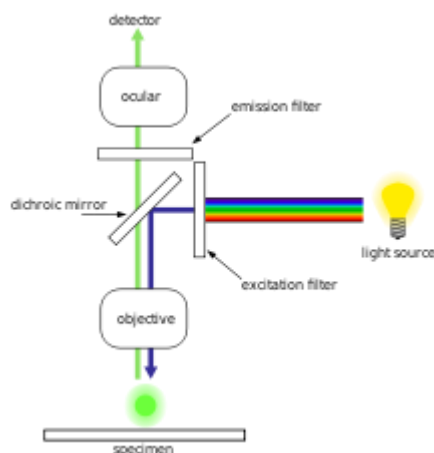
Poměr mezi emisními a absorpčními kvanty, lze vyjádřit pomocí kvantového výtěžku. Kvantový poměr se udává v rozmezí od 0,1 do 1. Pokud je kvantová hodnota menší jak 1, došlo ke ztrátě energie. Tato energie není světelného původu, většinou je to

energie tepelná nebo taková, která vznikla při fotochemické reakci [22].

Všechny tyto faktory, jako je extinkční koeficient, kvantový výběžek, dostatečný jas světelného zdroje, délka trvání fluorescence a jiné jsou důležitými parametry, které vedou ke zlepšení intenzity a užitečnosti emisní fluorescence [22].

4.5 Konstrukce

Mikroskop je přístroj, který obsahuje soustavu čoček s jednou optickou osou. Skládá se ze tří částí - mechanické, světelné a optické. Od ostatních se fluorescenční mikroskop odlišuje specifickými díly [23].



Obrázek 4.4: Konstrukce fluorescenčního mikroskopu

[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/1c/FluorescenceFilters_2008-09-28.svg/220px-FluorescenceFilters_2008-09-28.svg.png]

Při pozorování pomocí fluorescenční mikroskopie vzniká ve většině případů emise s velmi nízkou úrovní. Tím pádem pak na detektor dopadne méně fotonů. Účinnost mikroskopů zachytit fotony se pohybuje pod 30%. Intenzitu zvyšují fluorofory, které se dostanou do optické dráhy, většinou se ale jedná o velmi malá množství v rozmezí mikromolů nebo nanomolů. K vytvoření dostatečně vysoké intenzity, při které bude emise dostatečně detekovatelná, jsou potřebné výkonné zdroje světla [22].

Vhodnými zdroji ve fluorescenční mikroskopii jsou zejména vysokoenergetické výbojky s krátkým obloukem. Zdroj světla ve fluorescenčním mikroskopu tvoří především fluorescenční lampy. Jedná se o vysokotlaké výbojky. Nejčastěji se používají rtuťové nebo xenonové. Rtuťové výbojky jsou tvořeny skleněnými trubičkami. Ty jsou naplněné výpary ze rtuti a jsou umístěny mezi dvě elektrody. K ionizaci rtuťové páry dochází při hodnotách napětí okolo 600 V, jakmile proběhne ionizace, dojde ke vzniku obloukovému výboji. Na stejném principu je založena i xenonová výbojka. Rozdíl mezi výbojkami je v napájení a výkonu. Rtuťové výbojky mají výkon od 50 až do 200 W s xenonové výbojky od 75 do 150 W. Nejčastějším typem napájení je pomocí stejnosměrného proudu z externího zařízení [22][29].

Díky výbojkám lze získat vyšší intenzitu emise, ale nedokáží to pro celé spektrum od ultrafialového záření až po infračervené záření. Dokáží zvýšit intenzitu pouze

v určitých oblastech. Rtuťová výbojka dokáže poskytnout vysokou intenzitu emise hlavně v blízkosti ultrafialového spektra. Nejvyšší intenzity dosahuje na 313, 334, 365, 406, 435, 546 a 578 nanometrů vlnové délky. V oblasti viditelného světla na jiných vlnových délkách, poskytují rtuťové výbojky stabilní intenzitu emise. Přičemž osvětlení není zdaleka tak jasné, ale i tak je vhodné pro pozorování [22].

Součástí mikroskopu nebo externího zdroje napájení bývá i časovač, který slouží ke stopování času, kdy je zdroj světla neboli výbojka v provozu. Při překročení životnosti lamp je to díky časovači zaznamenáno a výbojka se může závčas vyměnit. Doba životnosti výbojky je v rozsahu 200-300 hodin. Po překročení této životnosti dojde k poklesu účinnosti zdroje světla a může dojít k jejímu poškození [22].

K nastavení rozsahu světelného paprsku slouží optické filtry. Jedná se o filtr excitační a emisní. Slouží k výběru požadovaných vlnových délek ze zdroje světla [30]. Excitační filtr umožňuje vybrat rozmezí vlnových délek světelného zdroje nutných pro excitaci a je tak často označován jako budič. Emisní filtr slouží k odstranění nežádoucích prvků ze světelného paprsku, který vychází ze vzorku. Je schopen vymezit pouze tu část spektra, kde se vyskytuje hlavní úsek signálu. Jednoduše si jej lze představit jako takovou bariéru [22][31].

Dříve byly fluorescenční filtry vyráběny z barvených skel. Jako filtr se využívala i želatina. Sklo nebo želatina se pak vkládaly mezi dvě skleněné desky, kde sloužily jako filtry. To dnes ale nestačí, jelikož jsou požadovány nároky na vysoká rozlišení, na schopnosti propustit či zamezit prostupu určitých vlnových délek světla, na specifičnost vlnových délek a na dostatečnou propustnost [22].

Excitační a emisní filtry jsou snadno vyměnitelné. K mikroskopu jsou upevněny pomocí příchytěk, optickým lepidlem nebo jsou zde umístěny v kruhových závitech, které jsou připevněny k mikroskopu. Filtry tedy nejsou zabudovány přímo v mikroskopu a není nutné při jejich výměně otvírat optický blok. To ale neplatí u dichroického zrcadla, při jeho výměně je zcela nezbytné tento blok otevřít a jeho výměna je technicky náročnější, jelikož probíhá uvnitř mikroskopu [32].

Dichroické zrcadlo odráží záření zvolených vlnových délek ze zdroje a naopak propouští záření jiných vlnových délek ze vzorku k detektoru. Odražené světlo je excitační záření a odráží se do dráhy světla pod úhlem 90 stupňů a dále se šíří do objektivu, přičemž samo zrcadlo je nastaveno tak, aby pracovalo pod úhlem 45 stupňů. Propouštěné světlo je záření z emisního filtru a směřuje do okulárů. Zde uplatňuje také jako přenosový filtr. Dichroické zrcadlo se může vyskytovat i pod názvem dichromatický dělič svazku. Dichroická zrcadla jsou umístěna společně s interferenční vrstvou čelem ke zdroji excitace. Fluorescenční filtry jsou uspořádány společně i se zrcadlem tak, aby vybraná oblast excitačních vlnových délek byla ve shodě s vybranou oblastí vlnových délek odrazu v dichroickém zrcadle. Tak dojde k získání optimálního výsledku odrazu, jehož světlo se šíří dále mikroskopem až ke vzorku. Nutná je i shoda fluorescenční emise ze vzorku s oblastí vysokých vlnových délek pro přenos, která je parametrem v dichroickém zrcadle. Shoda je potřebná proto, aby vlnové délky vzniklé emise, mohly projít přes zrcadlo až k detektoru [22][31][32].

Při sestavování kombinací filtrů je důležité zajistit, aby došlo ke shodě spekter přenosného, odrazového a emisního profilu k jejím vlastním oblastem vlnových délek. Musí se správně zvolit oblast vlnových délek k daným profilům spekter. Tím by se mělo zabránit i prolínání spekter jednotlivých profilů. Kdyby došlo k situaci, kde by spektra

daných profilů neodpovídala daným oblastí vlnových délek, excitační světlo by se mohlo šířit přes dichroické zrcadlo, místo toho aby se odrazilo nebo naopak emisní světlo, které má být přes zrcadlo propuštěné dále, by se mohlo od zrcadla odrážet a vznikl by tak zamlžený nebo nejasný obraz. Někdy ale úplnému prolínání spekter zamezit nelze, i když jsou filtry dokonale zkombinovány a nastaveny. Toto prolínání se velmi často vyskytuje mezi přechody u excitačního filtru a dichroického zrcadla. Některé části z excitačního světla se totiž nemusí od zrcadla vždy úplně odrazit a zrcadlem projdou dále, kde se odráží až od stěn filtračního bloku a šíří se dále přes emisní filtry. Jedná se o takový únik přes filtry a často je takový únik označován jako prosvítání. Prosvítání se nachází téměř u všech kombinací filtrů. Při téměř dokonale zkombinovaných dojde k malému úniku přes filtry, u jiných méně přizpůsobených typů kombinací se vyskytuje prosvítání ve větší míře [32].

Intenzita vzniklého obrazu je závislá na numerické apertuře objektivu a na jeho zvětšení. Podle vztahu (1) [32] se jas nebo intenzita zvětšují na základě 4. mocniny numerické apertury, přičemž je nepřímo úměrná 2. mocnině zvětšení.

$$I = \frac{NA_{obj}^4}{M^2} \quad (1)$$

Kde zkratka NA_{obj} odpovídá numerické apertuře objektivu, a M vyjadřuje míru zvětšení. Ze vztahu tedy vyplývá, že největší intenzity fluorescenčních obrazů dosáhneme s vyšší hodnotou numerické apertury objektivu a s malým zvětšením [32].

Velmi důležitou částí fluorescenčního mikroskopu je vertikální iluminátor, který se nachází ve středu konstrukce mikroskopu. Je umístěn mezi okuláry a otočnou hlavicí objektivu. Funkcí iluminátoru je světlo, které je produkováno světelným generátorem, nasměrovat přímo na vzorek hned při prvním průchodu světla objektivem mikroskopu. Následně za pomoci toho samého objektivu zachytit světlo, které je emitováno z ozářeného vzorku [32].

Na jednom ze dvou konců vertikálního iluminátoru se vyskytuje prostor, v němž jsou zabudovány výbojky sloužící jako zdroje světla. Tento prostor je opatřen krytem. Světlo produkované těmito zdroji se šíří přes kryt, kde je zachyceno systémem sběrných čoček, a pokračuje přes iluminátor. Takto se světlo šíří paralelně směrem ke stolu a kolmo k optické ose mikroskopu. Uvnitř krytu se kromě zdrojů světla vyskytuje také tepelný filtr, který odstraňuje složky infračerveného světla [32].

Neméně důležitou součástí konstrukce fluorescenčního mikroskopu, je klapka. Je nezbytná zejména při pozorování živých buněk či bakterií, jelikož působení kontinuálního světla na tyto živé struktury působí negativně a dokáže tak na určitou dobu přerušit osvětlení. A při delším pozorování může kontinuální světlo ovlivnit také emisi, kdy ji může snížit a dochází tak k procesu blednutí. Při použití klapky je možné nechat výbojky aktivní, při pozorování vzorků se vzniklým osvětlením [32].

Mikroskop je opatřen ochranou před ultrafialovým zářením. Jedná se o štít, který se nachází na přední straně iluminátoru. Tento štít pohlcuje, zachycuje a brání dalšímu úniku ultrafialového záření, které se může dostat ven při neopatrné obsluze mikroskopu a zejména pokud dojde k otevření závěrky mikroskopu. Štít chrání nejen osobu, která pracuje s mikroskopem, ale také vzorek, kde snižuje působení vydechovaného vzduchu osobou, která vzorek pozoruje [32].

Pozice vertikálních iluminátorů by měly být uspořádány tak, aby poskytovaly otvor

pro obdélníkové polarizační rámce, které se využívají pro ověření fluorescenční polarizace. Tento polarizátor bývá vložen do dráhy osvětlení v pohyblivém rámu. Pokud není polarizátor pro pozorování potřebný, lze ho jednoduše vyndat z rámu. Při použití dvou polarizátorů je možné změřit fluorescenční anizotropii [32].

Součástí vertikální osvětlovače je otočná věž nebo držák, do nichž lze vkládat zvolené kombinace fluorescenčních filtrů. Jedná se o filtrační bloky, které lze dle potřeby otáčet nebo posunovat do světelné dráhy. Výhodou těchto filtračních bloků je, že se lze dostatečně rychle přepínat mezi různými kombinacemi filtrů. Přepínání je navíc možné přímo při pozorování vzorků [32].

5 KONFOKÁLNÍ MIKROSKOP

Konfokální mikroskop se od fluorescenčního liší ve dvou základních věcech:

Za první tím, že nevytváří okamžitě spojitý obraz ze zorného pole, ale obraz je postupně skládán (skenován) z malých téměř bodových oblastí (velikost řádově desetin až tisíciny mikrometru) [23]. Do detektoru je tedy vpouštěn pomocí speciální aparatury vždy v daném čase jen fluorescenční paprsek z této velmi malé oblasti.

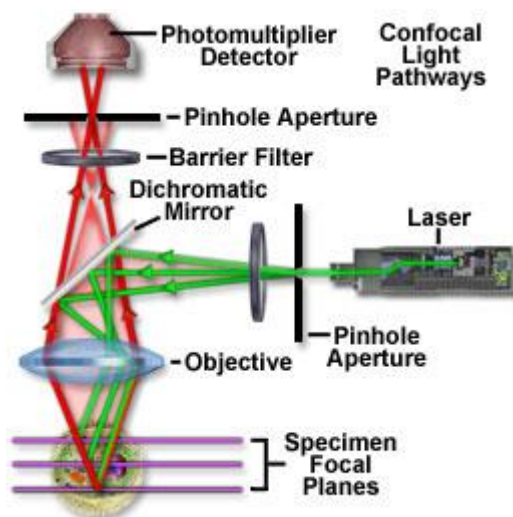
Za druhé tím, že obraz složený z těchto „bodů“ zobrazuje jen velmi tenkou vrstvu bez parazitní fluorescence z vrstev nad nebo pod touto zvolenou vrstvou (u klasického i fluorescenčního mikroskopu je vždy přítomné určité prolnutí vrstev, u konfokálního mikroskopu je eliminováno na minimální hodnotu cca 0,1 mikrometru) [23]. Uživatel si však samozřejmě může nastavit proskenování více vrstev nad sebou a tak dostane obraz nejen jedné vrstvy, ale celý obraz trojrozměrné struktury vzorku.

Vývoj konfokálního probíhal od 50. do 70 let, a je nutno říct, že technika na separaci úzkého výseku paprsků z daného bodu není jen jedna, ale postupně se vyvinulo technik více (Marvin Minsky, Egger a Petrář, Davitson). Také zdroje excitačního světla se postupně vyvíjely a zdokonalovaly (od lamp známých z fluorescenčních mikroskopů po lasery a speciální diody). V 80. a 90. letech následovalo již komerční období prodeje těchto mikroskopů, ale neustále přicházela nová zlepšení v oblastech optiky, konstrukce, uspořádání, zlepšení laserů a zdokonalení zrcadel a fotodetektorů. Následně docházelo i k rozvoji nových fluorochromů. Konfokálním mikroskopem tedy nelze zobrazovat nefluorescenční biologické vzorky, ani příliš velké vzorky (velká vrstva působí útlum fluorescence a rozptyl světla) nicméně pro precizní zobrazení morfologií různých organel a membrán uvnitř buňky, nebo pro polohu malých buněk uvnitř tkáňového řezu se staly konfokální mikroskopy naprosto jedinečnou technikou a navíc pomocí dobrého softwaru konfokálního mikroskopu lze i získat virtuální 3D obraz buněk a tkání [33][34].

5.1 Princip

Na Obr. 4.1 je schéma jednoho ze základních nejjednodušších konfokálních mikroskopů. Zde lze dobře ilustrovat základní chod excitačního paprsku a selekci paprsků emisních. V horní části je vidět typický detektor – fotonásobič (není použitelná klasická míra, neboť intenzity z malých plošek jsou velmi malé) [33]. Fotonásobič je pak napojen na elektroniku a procesor, který ukládá data a synchronizuje čas detekce se svitem laseru a posunem vzorku. Nesmíme však zapomenout, že buňka musí v daném místě mít buď autofluorescenční látku (přírodní, např. DNA, metabolity), nebo musíme specifické místo označit specifickou fluorescenční barvou (např. protilátkou proti VEGF-receptoru, proti conxinu, mitochondriální membráně atd). Pokud zde není žádná látka excitovatelná danou vlnovou délkou laseru, emise je nulová a detektor zadetekuje nulový signál (v obraze pak znázorněno jako černé nesvítící místo ve vzorku). Z nákresu na Obr. 4.1 je také dobře patrné, že v běžných mikroskopech rozptýlené paprsky zhoršují kvalitu zobrazení vzorku, u konfokálního je tomu zabráněno a získá se poměrně kvalitní obraz z daného bodu [33][34].

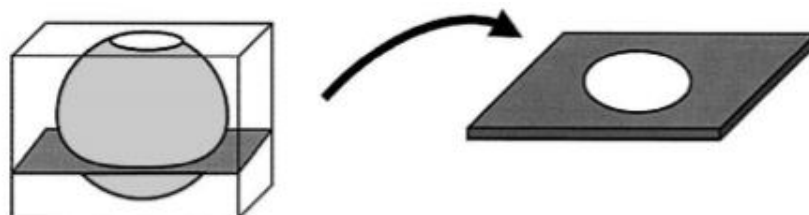
Abychom mohli detekovat fluorescenci postupně v mnoha bodech vzorku, je u konfokálního mikroskopu přidavné technické zařízení, která umožní „přeostříit“ postupně



Obrázek 5.1: Konstrukce konfokálního mikroskopu

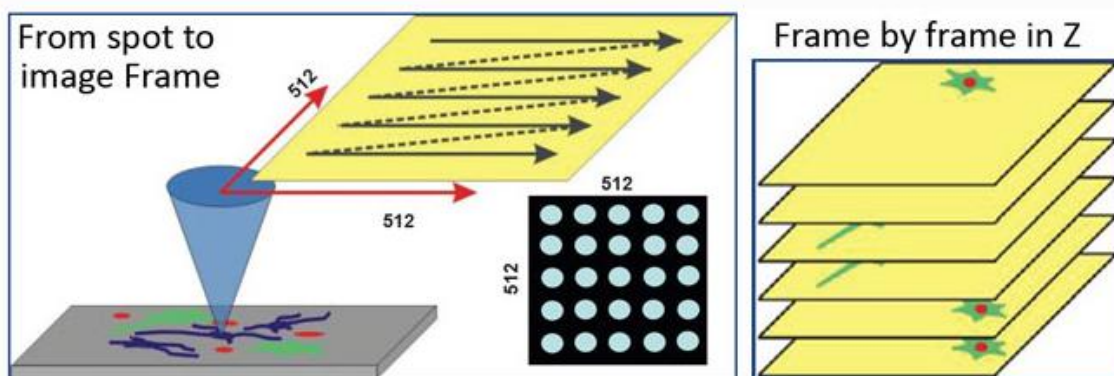
[<http://fluoview.magnet.fsu.edu/theory/images/theoryheader.jpg>]

na další „plošky“ v rovině X-Y, respektive i přeostrit v ose Z. O konkrétní technice pojednává řada publikací a manuálů výrobců (přeostrění je řešeno posuvnými mikromotory ale i speciálním doostřováním optických prvků). [34] Ilustrativní schéma postupného přeostrování a následné rekonstrukce obrazu je na Obr 4.5. Obr 4.4 ukazuje typický sken roviny uprostřed kulovité buňky.



Obrázek 5.2: Optický řez v konfokální mikroskopii

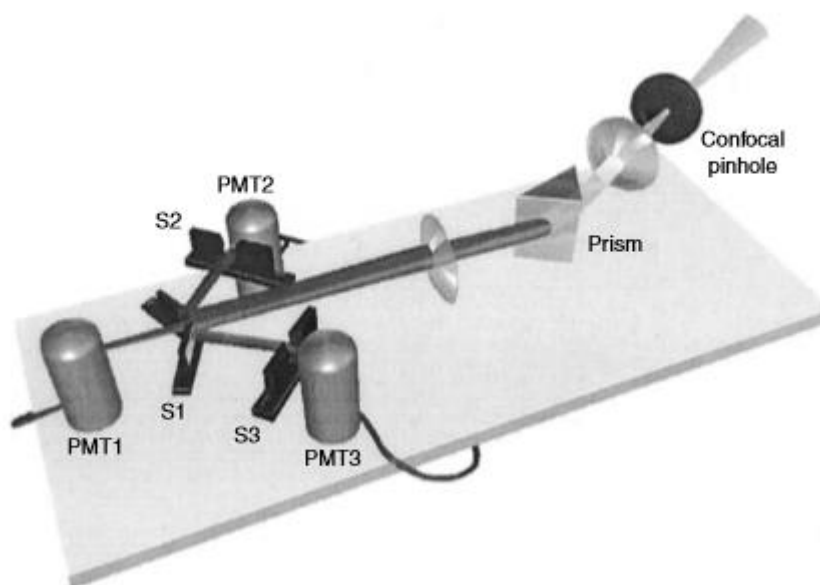
[WRIGHT, Shirley J.; WRIGHT, David J. Introduction to confocal microscopy. *Cell Biological Applications of Confocal Microscopy*, in *Methods in Cell Biology*, 2002, 70: Fig. 1 Diagram showing generation of optical sections in the confocal microscope]



Obrázek 5.3: Konfokální mikroskopie - skenování bod po bodu

[<http://www.microscopist.co.uk/essential-techniques/confocal-microscopy/>]

Díky těmto řezům se lze pomocí konfokálního mikroskopu velmi dobře zaměřit například jen na určitou organelu (například jádro, mitochondrii). Obr 4.5 také dobře ukazuje, že při použití jednoho laseru (např. 490 nm) se rozsvítí více fluoroforů (červený, zelený atd). Detekovaných fluorescenčních barviv nebo protilátek tedy může být ve vzorku více (detektorů musí být tedy také více, viz Obr 4.6, případně jeden, ale s postupně vyměnitelnými předřadnými filtry. Obraz se tedy například nejprve skenuje pro zelenou, pak žlutou, pak červenou) [34].



Obrázek 5.4: Spektrofotometrický detektor - schéma (PMT - fotonásobič, S - štěrba)

[WRIGHT, Shirley J.; WRIGHT, David J. Introduction to confocal microscopy. *Cell Biological Applications of Confocal Microscopy, in Methods in Cell Biology*, 2002, 70: Fig. 16 The spectrophotometric photodetection system. PMT1–3, photomultiplier tubes 1–3; S1–3, slit systems 1–3. See text for details. (Courtesy of Leica Microsystems, Heidelberg.)]

5.2 Technické detaily

Nejčastějším zdrojem světla pro konfokální mikroskopii je laser nebo dříve také rtuťové nebo xenonové výbojky stejně tak, jako u fluorescenční mikroskopie. Lze si vybrat vlnové délky ze spektra ultrafialové, viditelného nebo infračerveného záření. Rozdíly u laserových zdrojů jsou i v jejich náplni, které tvoří různé zemní plyny. Každý laser může mít i různé chladicí systémy, jiné výstupní výkony nebo jinou dobu životnosti [34].

Nejpoužívanějšími lasery jsou argon-iontové lasery, které bývají chlazené vzduchem nebo vodou. Následují krypton-argonové lasery vzduchem nebo vodou. Následují krypton-argonové lasery, helium-kadmiové lasery, UV lasery a infračervené lasery. Některé lasery umožňují vyzařovat více vlnových délek. Takové lasery mohou pracovat buď v režimu pro samostatné vyzařování jedné délky, nebo ve speciálním režimu multiline. Každý laser zahrnuje určité vlnové délky a tak jedním laserem nelze excitovat každé fluorescenční barvivo. Argon-iontový laser emituje při vlnových délkách

488 až 514 nm, tyto vlnové délky tedy nejsou vhodné pro excitaci ultrafialových fluorochromů, které na své vybuzení potřebují vlnové délky pod 400 nm [34].

Lasers Commonly Used in Confocal Laser Scanning Microscopes

Type of laser	Power (mW) ^a	Emission wavelength (nm)				
		UV	Blue	Green	Yellow	Red
Argon Ion	10		488			
Argon Ion	25		488	514		
Argon Ion	100		457	514		
			488			
Argon Ion UV/Visible	250	351	488	514		
		363				
Krypton Argon	15		488		568	647
Krypton	10				568	
Helium Cadmium	10		442			
Green Helium Neon	1			543		
Red Helium Neon	10					633
Red Laser Diode	5					635

Obrázek 5.5: Lasery používané v konfokální mikroskopii

[WRIGHT, Shirley J.; WRIGHT, David J. Introduction to confocal microscopy. *Cell Biological Applications of Confocal Microscopy, in Methods in Cell Biology*, 2002, 70: 17. Tabel 1 Lasers Commonly Used in Confocal Laser Scanning Microscopes]

Životnost laseru se pohybuje podle typů od 2 000 až po 15 000 hodin. Malou dobu životnosti okolo 2000 hodin má například krypton-argonový laser. Vyšší životnosti mají argon-iontový laser, jehož doba životnosti může být až 7 000 hodin, a helium-neonový laser, jehož doba životnosti může dosáhnout až 15 000 hodin. Životnost laseru může být ovlivněn jeho výkonem. Při použití nižšího výkonu, může dojít k úspoře životnosti o několik procent [34].

Důležitou částí konfokální mikroskopie je snímací hlava, do které patří filtry, skenovací zrcadla, konfokální apertura, závěrka a skenovací systém. Některé konfokální mikroskopy jsou vybaveny funkcí ve snímacím systému, který umožňuje změnit směr skenování během skenování. Díky tomu lze snížit čas nutný pro naskenování daného vzorku, což je výhodné zejména při sledování rychlých buněčných procesů. Lasery bývají umístěny většinou vně přístroje a světlo je dovedeno optickým precizním vláknem [34].

Některé moderní konfokální mikroskopy využívají i spektrofotometrického detekčního systému, který dokáže získat informaci o spektru světla (jinými slovy proměří každý bod vzorku při předřazeném filtru, například postupně 500, 510, 520, 530, 540 až 800 nm a nakonec zkonstruuje histogram pro celý interval [34].

Nedílnou součástí konfokálních mikroskopů jsou také počítače. Nastavení skenování lze tak většinou libovolně měnit i pomocí počítače. V počítači lze nastavit například intenzitu laseru, vybrat clony, zvolit nastavení k zaostřování vzorků, pohyb a rychlost skenovacích zrcadel. Počítač je zde výhodný i proto, že v něm lze snímat obraz v reálném čase a uložit jej. Monitor by měl mít velmi vysoké rozlišení barev. Monitor zde slouží zejména k zobrazování získaných obrazů z konfokálního mikroskopu. Aby mohl být mikroskop ovládán pomocí počítače, musí počítač obsahovat určitý software, který ovládání umožňuje. Na trhu existuje více typů takový softwarových programů. Mezi takové programy patří LaserSharp, PowerScan a Intervision. Díky softwarovému vybavení lze ukládat získané obrazy v digitální formě v různých formátech. Kromě

ukládání do různých formátů, je možné snímky pomocí softwarového programu barevně upravovat a vytvářet 3D rekonstrukce obrazu [34].

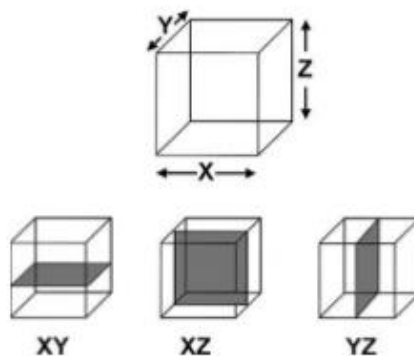
Důležitými parametry jsou „prostorová rozlišení v daném vzorku“ (nejmenší vzdálenost, při které lze ještě odlišit dva objekty, například dvě červené makromolekuly v buňce) a tzv. „výsledné rozlišení výstupního obrazu“. Rozlišení obrazu mezi, kterými si lze vybírat, je většinou buď 1024x1024 nebo 2048x2048 pixelů. V novějších modelech konfokálních mikroskopů je možné zobrazit obraz s rozlišením 4096x4096 pixelů. Ovšem vytváření obrazů, které se skládají z velkého množství pixelů, může trvat delší čas. Čas, který vyjadřuje tuto dobu, se nazývá rychlost skenování [34].

5.3 Výhody

Výhodou konfokálního mikroskopu je především ve vysokém rozlišení v ose X a Y a možnosti skenovat nezávisle jednotlivé roviny v ose Z. Další podstatnou výhodou je, že pomocí netoxických značek, lze značit i živé buňky bez fixace a tak lze pozorovat živé vzorky, jejich pohyb a i struktury uvnitř buněk [34].

Další výhodou konfokální mikroskopie je, že oproti konvenčnímu světelnému a elektronovému mikroskopu, dokáže poskytnout obrazy ze sérií optických řezů vzorku, které pomocí softwaru můžeme transformovat do 3D modelu [34].

Další výhodou je, že optické řezy lze získat v různých rovinách. Lze vybírat osy z rovin y, x, z. Vybraný úsek může být v rovině, která je kolmá k optické ose mikroskopu nebo může být v rovině, která je rovnoběžná k optické ose mikroskopu. Nejvíce se využívají vodorovné úseky z roviny xy, jelikož prostorové rozlišení je zde lepší než u rovin xz a yz. Roviny xz a yz jsou rovnoběžné se stolkem mikroskopu, jejich směr je svislý. [34]



Obrázek 5.6: Roviny optických řezů v konfokální mikroskopii

[WRIGHT, Shirley J.; WRIGHT, David J. Introduction to confocal microscopy. *Cell Biological Applications of Confocal Microscopy*, in *Methods in Cell Biology*, 2002, 70: Fig. 3 Optical sectioning in the confocal microscope.]

Všechny optické řezy jsou v digitální podobě. To je výhodné pro následné zpracování, které je díky digitální formě jednodušší. V této formě je možné výsledek vytisknout přes tiskárnu [34].

5.4 Nevýhody a omezení konfokálního mikroskopu

Donedávna bylo podstatnou nevýhodou u konfokální laserové rastrové mikroskopie zejména omezený výběr budící vlnové délky, tyto excitační zdroje byly omezené jen na několik tradičních vlnových délek (490 nm, 520 nm, 630 nm) klasických dostupných laserů (každý laser produkuje záření v určitém pásmu vlnových délek a tato pásma jsou většinou velmi úzká). V posledních letech ale zejména výrobce Leica přišel s velmi důmyslným řešením, začali se do mikroskopů osazovat tzv. laditelné lasery, například mikroskop SP8X na našem pracovišti má možnost ladění libovolné excitační vlnové délky v rozsahu 430 až 750 nm. Další nevýhodou oproti klasickému mikroskopu je delší čas snímání. I když snímáme například vzorek o ploše 1mm², je doba skenování řádově několik minut. Proto ne všechny skenovací módy jsou vhodné pro detekci pohybujících se živých vzorků ale většinou jen pro vzorky statické [34][35].

Podstatnou nevýhodou je i pořizovací cena konfokálních mikroskopů. Tato cena může být i 10 krát vyšší než je cena fluorescenčního mikroskopu včetně příslušenství. Cena se odvíjí na základě vybavení mikroskopu, výkonnosti softwaru, a příslušenství. Ve výzkumných centrech a institucích se cena často minimalizuje tak, že je pořízen jeden mikroskop na několik pracovišť [34][35].

Sdílené mikroskopy obsahují nově i osobní konfokální systémy, které umožňují vytvoření jednotlivých osobních účtů pro každého uživatele a usnadňuje jim tak práci, například v nastavených parametrech. Osobní konfokální systémy jsou i jednodušší pro pochopení a orientaci, jelikož obsahují méně funkcí. Ve víceuživatelských konfokálních systémech je ovládacích prvků o mnoho více. K financím se váže i průprava uživatelů. Většina softwarů je vytvořeno tak, aby byly jednoduché na ovládání. Přesto je nutné poskytnout uživatelům těchto mikroskopů odborné přípravy, které je naučí se softwarem pracovat, pochopit principy a využívat dostupné prvky tak, aby dostali co nejlepší konfokální snímky [34].

Poslední nevýhodou může být i rozměr a celková velikost konfokálního mikroskopu. Je nutné počítat s tím, že zabírají více místa než jiné mikroskopy. Jsou větší než klasické i fluorescenční mikroskopy. Jejich celková velikost je dána tím, že pro svoji funkci potřebují laser a budící zdroj a případně chladicí jednotku, PC nebo server jako uložisko dat [34].

6 PRAKTICKÁ ČÁST

Předmětem této kapitoly je popis a hodnocení provedených praktických úkolů. Základem praktické části bylo provést kultivaci buněk v jamkách s několika odlišnými podmínkami dané různými typy povrchu. Poté zkoumat jejich vývoj a změny. Cílem bylo dosažení konfluence buněk a jejich vyhodnocení pomocí programu. Buňky byly pozorovány pomocí konfokálního a světelného mikroskopu.

6.1 Seznam laboratorních pomůcek a přístrojů

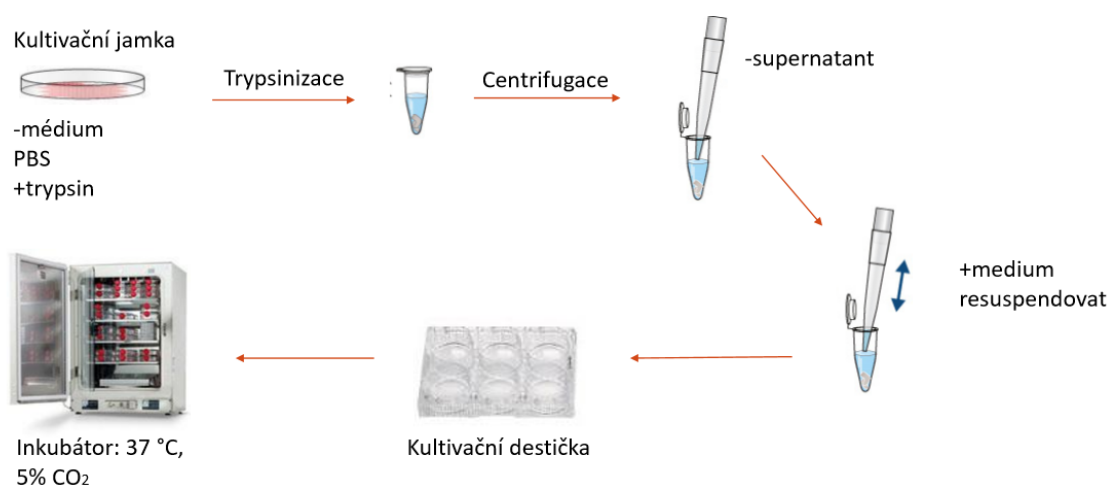
- /1/ Mikroskop, Olympus IX71
- /2/ Laminární box, aura mini, BioAir, EuroClone
- /3/ Centrifuga, EBA 20, Hettich
- /4/ Inkubátor, IPP110plus, MEMMERT
- /5/ Termostat, Julaba, Maneko
- /6/ Chlazená mikrocentrifuga, Z 216 MK, Hermle Labortechnik
- /7/ Pipety, HTL Lab Solutions
- /8/ Endoteliální buňky, HUVEC Lonza
- /9/ Embryonální buňky, HEK293 Lonza
- /10/ Médium, Endothelial Cell Growth Medium, Lonza
- /11/ PBS, Phosphate buffered saline, P4417, SIGMA
- /12/ Trypsin-EDTA (0.05%), Phenol red, Gibco™
- /13/ Fibroblasty, NIH 3T3 Cell line murine, 93061524 SIGMA
- /14/ Barvivo, Calcein-AM suitable for fluorescence, SIGMA
- /15/ Konfokální mikroskop Leica TCS SP8X
- /16/ Želatina, Gelatin from porcine skin, G1890 SIGMA
- /17/ Barvivo, Hoechst 33258, SIGMA-ALDRICH

6.2 Metodika přípravy tří typů buněk

Provedli jsme řadu experimentů s endoteliálními (HUVEC), embryonálními buňkami (HEK293) a fibroblasty. Důležitým krokem tohoto experimentu bylo pasážování. Jedná se o proces kdy z kultivační misky, která obsahuje konfluentní buňky, vytvoříme v nové misce novou subkulturu buněk. Práci s buňkami je nutno provádět v laboratoři v čistých podmínkách. A samotná pasáž se provádí v laminárním boxu, který má filtrovanou atmosféru vzduchu. Je tak sníženo riziko vniku bakterií do misky po jejím otevření.

Experiment probíhal podle konvenčního postupu. Objemy se přidávaly na základě velikosti jamek. Prvním krokem bylo z konfluentní misky odsát veškeré médium, které

v ní bylo obsaženo. Následně se povrch jamky s buňkami dvakrát propláchl látkou PBS, která odstranila zbytky média, které se v prvním kroku nepodařilo úplně odsát. Jedná se zejména o mikroskopické objemy. Potom byl do prázdné jamky s adherovanými buňkami přidán trypsin a na 3 minuty se preparát vložil do inkubátoru. Ve stavu, kdy byly buňky odlepené ze dna misky, se k nim přidalo čerstvé médium. Směs se poté musela několikrát resuspendovat a následně centrifugovat po dobu 3 minut na 1500 rpm. Po centrifugaci se odsál přebytečný supernatant a k buňkám se přidalo opět nové čerstvé médium. Směs se následně několikrát resuspendovala, aby došlo k rozptýlení buněk v roztoku. Do zcela nové prázdné jamky se převedlo určité množství buněčné suspenze a k ní nové čerstvé médium. Hotová jamka byla uložena do inkubátoru, kde byla teplota nastavena na 37 °C a množství oxidu uhličitého nastaveno na 5 %. Buňky se sledovali několikrát do týdne. Dle potřeby se měnilo živné médium, většinou tak bylo 2-3 krát to týdne. Jakmile bylo dno jamky pokryto buňkami z více jak 80 %, bylo žádoucí provést další pasáž.



Obrázek 6.1: Schéma experimentu

6.3 Metodika nastavení kultivačních podmínek a jejich evaluace

Sledovali jsme vliv odlišných podmínek na růst buněk. Odlišné podmínky byly navozeny u embryonálních buněk HEK293 a fibroblastů. Jednalo se o změny povrchů v kultivačních miskách či destičkách. Základním povrchem bylo sklo a jinými povrchy byly sklo potažené želatinou z prasečí kůže G1890 a konfokální miska, jejímž povrchem byl polystyren. Růst buněk na želatině byl sledován u obou druhů buněk. U konfokální misky byl sledován růst buněčné linie HEK293.

Želatina byla aplikována na povrch misky či destičky. Jednalo se o 0,1% koncentraci želatiny. Na vytvoření tohoto povrchu na jednu jamku kultivační destičky bylo potřeba 200 µl želatiny v tekutém stavu. Následně došlo k převodu hotové směsi do jamky. Potom bylo nutné vložit destičku do inkubátoru na dobu 30 minut a nechat želatinu přilnout k povrchu skla. Po uplynutí stanovené doby se odsála přebytečná směs a bylo možné okamžitě do jamky aplikovat buněčnou směs s médiem.

Před sledováním buněk v konfokálním mikroskopu, je bylo nutné obarvit potřebným fluorescenčním barvivem. Pro obarvení buněk nám sloužilo fluorescenční barvivo

Calcein-AM a pro obarvení jader fluorescenční barvivo Hoechst 33258. Obarvení jader bylo vhodné pro počítání buněk.

Barvicí směs byla vytvořena barvivem Calcein-AM o objemu 0,01 μl a médiem s objemem 100 μl . Objemy byly přidány do ependorfky, kde došlo k jejich promíchání resuspendací. Než se ale přidalo barvivo k buňkám, bylo nutné odsát médium. Po odstátí bylo možné přidat k buňkám barvicí směs a nechat působit 10 minut v inkubátoru, kde došlo k procesu obarvení. Po 10 minutách se barvicí směs odsála, přidalo se médium a následně bylo možné buňky sledovat konfokálním mikroskopem.

6.4 Sběr dat

Buňky byly pozorovány konfokálním mikroskopem a světelným mikroskopem. U objektivu se využívalo zvětšení 10x nebo 20x. Pro vysvětlení a názorné předvedení vývoje konfluence buněk bylo vyfoceno několik snímků ze světelného mikroskopu. Na každém snímku je vidět jiná koncentrace buněk. Na snímcích lze pozorovat buňky HEK293 (viz Obrázek 5.2).



Obrázek 6.2: Buněčná linie HEK293, světelný mikroskop, zvětšení 10x, polarizační objektiv

V první den experimentu, kdy se provádí pasáž, se pouze zkontroluje množství buněk po pasáži a buňky se ihned vloží do inkubátoru. Focení buněk probíhalo za 24 hodin od nasazení buněk. Tato doba zajistila adhezenci buněk k povrchu.

Další dny po pasáži je tedy možné buňky pozorovat a zdokumentovat. Při pozorování konfluence jsou typické pro první dny po pasáži vyskytující se rozsáhlé prázdné prostory mezi buňkami. Buňky se vyskytují jak osamocené, tak vytvářejí i shluky, vznikající dělením buněk. Tyto shluky ale nejsou příliš početné. Konfluence je v prvních dnech velmi nízká.

Následující dny experimentu dochází k postupnému nárůstu buněk. Vytvářejí se více početné shluky buněk jejich dělením. Volné prostory ubývají a buněčné shluky se začínají vzájemně dotýkat. Další dny experimentu probíhá stále růst buněk. Vznikají již větší shluky buněk a volné prostory pomalu mizí (Obrázek 5.2). Tyto popsání procesy bývají znázorněny v růstové křivce buněk (viz 2.2 Růstová křivka buněk). Jedná se o lag fázi (první dny nasazení buněk) a log fázi (dělení buněk, zvyšuje se množství buněk), které byly při experimentu zpozorovány.

Dosažení dlouhodobého přežívání buněk bylo omezeno nedostatečnou zkušeností s kultivací buněk. Pomalý postup při kultivaci na buňky působil negativně. Dalším problémem byl výskyt kontaminace, který přerušil růst buněčné kultury. Navíc při kultivaci na skle nedocházelo k adhezenci a tím nešlo výsledky zdokumentovat. Použití povrchů želatiny a polystyrenu zajistilo adhezenci. Vlivem však obarvení docházelo ke

změně tvaru buněk a v takovém stavu nebylo možné pokračovat v jejich kultivaci. Změna tvaru byla zapříčiněna nejspíše špatně namíchanou koncentrací barviva, kde se používaly příliš malé objemy. Při tak malých objemech je složité namíchat správnou koncentraci.

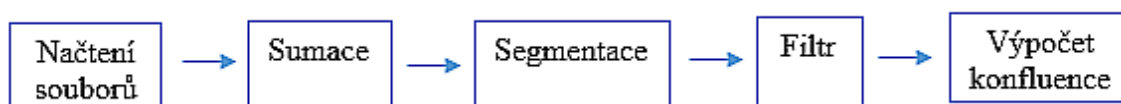
Pro vytvoření algoritmu sloužícího ke zhodnocení konfluencí buněk byly snímky pořízeny konfokálním mikroskopem Leica typem TCS SP8X, jehož zdrojem je bílý laser. Je vybaven UV zdrojem světla s vlnovou délkou 405 nm. V mikroskopu lze nastavit vlnové délky zdroje od 470 do 670 nm. Pro detekci využívá detektory PHT a HyD s detekcí od 400 do 700 nm.

Pro detekci buněk HEK 293 a fibroblastů obarvené Calceinem-AM byla nastavena excitace na hodnotu 490 nm a rozsah hodnot pro emisi byl zvolen od 500 nm – 550 nm. Pro fluorescenční barvivum Hoechst 33258 byl použit rozsah hodnot pro excitaci od 350 nm – 370 nm. Pro emisi bylo zvoleno rozmezí vlnových délek od 420 nm – 460 nm.

Bylo pořízeno několik sad snímků. Snímky v sadách se od sebe liší počtem Z-sekvencí. Tloušťka mezi jednotlivými řezy byla zvolena 1 μm nebo 0,3 μm . Celková tloušťka sady se liší podle počtu řezů od 3 μm výše. Sady obsahují různé počty řezů, nejmenším počtem jsou 3 řezy s tloušťkou 1 μm . Nejvyšší počet řezů pro sadu je 12 s tloušťkou mezi řezy 0,3 μm .

6.5 Realizace algoritmu pro vyhodnocení snímků

Pro vyhodnocení získaných konfokálních snímků byl vytvořen program v prostředí MATLAB (R2014a, The MathWorks, Inc). Hlavní funkcí tohoto programu je načtení a sumace originálních snímků typu tiff vygenerovaných mikroskopem Leica, a následně jsou snímky převedeny segmentací pomocí prahu či hran na černobílé. Na základě bílých a černých pixelů z černobílých snímků je vypočítána konfluencí na každém snímku či sadě snímků. Program lze popsat pěti kroky viz Obrázek 5.3.



Obrázek 6.3: Schéma programu pro segmentaci detekci hran

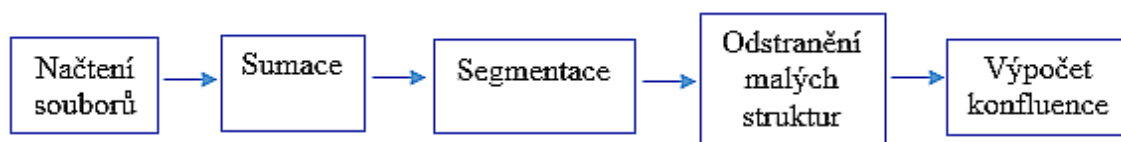
Prvním krokem v algoritmu je načtení snímků, které je potřeba vyhodnotit. K tomu je zapotřebí nejdříve nastavit cestu ke složce, kde jsou soubory uloženy. Cesta k souborům se nastaví pomocí příkazu *addpath*. Vzhledem k tomu, že snímky bývají uloženy ve složkách podle data pořízení, byl přidán do algoritmu příkaz *cd*, který umožňuje přecházet mezi požadovanými složkami. Jakmile je získán přístup ke složkám a daným snímkům, je vytvořen seznam daných souborů, které se v dané nastavené složce vyskytují. Seznam je sestaven pomocí příkazu *dir*, kde dochází k identifikaci snímků podle posledních znaků v jejich názvu – *dir('*00.tif')*. V seznamu jsou tedy všechny snímky, které mají ve svém názvu na konci *00.tif*. Datový typ získaného seznamu je typu *struct*, a jsou v něm obsaženy informace jako název souboru, datum vytvoření souboru, velikost souboru. Přes příkaz *numel* je zjištěn celkový počet snímků, které byly uloženy do seznamu. Tato informace bude dále využita, pro realizaci *for* cyklu. Obrazová data, která jsou potřebná pro zobrazení a úpravu obrazu, jsou uložena do struktury *cell*, jelikož zde došlo k uložení dat všech identifikovaných snímků ve složce. Následně je

vytvořen *for cyklus*, kde dojde k postupnému uložení obrazových dat z každého souboru. Potom jsou všechny získané hodnoty snímků sečteny a společně tak vytváří jeden snímek. Přestože je ve složce více snímků, jedná se o jeden vyfocený úsek. Ten je pouze několikrát vyfocen v různých z-rovinách.

Získaný snímek následně projde dvěma různými metodami k získání hodnot konfluence. První z nich je založena na detekci hran jednotlivých objektů v obraze přes příkaz *edge*. Je zde určen automatický práh podle zvolených metod – Sobel, Prewitt. Uživatel si zde ale může určit intenzitu sklonu těchto hran. Ta je v programu primárně nastavena na hodnotu 0,7. Hodnota byla vybrána na základě zkoušení a vybrání nejlepšího výsledku. V daném obraze dojde k detekci hran objektů na základě vybrané metody a prahu s intenzitou. Při detekci je nutné, aby byly uzavřené objekty vyplněny a zvýrazněny bílou barvou. Vyplnění se dosáhne použitím příkazu *imfill*, s definovaným příznakem 'holes'. Následně je obraz převeden na černobílý s detekcí okrajů přes příkaz *bwperim*. Tento obraz je pak společně zobrazen do jednoho s původním snímkem.

Výsledkem jsou pouze ohraničené a vyplněné objekty bílou barvou, zbytek je pokryt černou barvou. Z výsledného obrazu je následně zjištěn počet bílých pixelů oproti zbytku okolí pomocí *for cyklu*. Algoritmus provede sumu všech pixelů, které mají hodnotu menší než 30, to jsou pixely s černou barvou nebo jejími odstíny. Zbytek pixelů v matici značí počet bílých pixelů. Danou hodnotu 30 lze zvýšit či snížit dle dosažených výsledků. K tomu může pomoci porovnávání výsledných snímků, jak moc se filtrovaný snímek liší od původního. Velikost matice daného souboru je využita pro zjištění konfluence, kde počet nalezených bílých pixelů je podělen celkovým počtem pixelů v daném obrazovém souboru. Tato hodnota je dále násobena hodnotou sto, k získání procentuálního zastoupení bílých pixelů v matici.

Zpracování snímků a následné zjištění konfluence ze sad snímků lze provést více způsoby. Pro srovnání byla vytvořena druhá metoda. Jedná se o metodu segmentace obrazu pomocí prahu. Tento algoritmus je složen také z 5 kroků viz Obrázek 5.4.

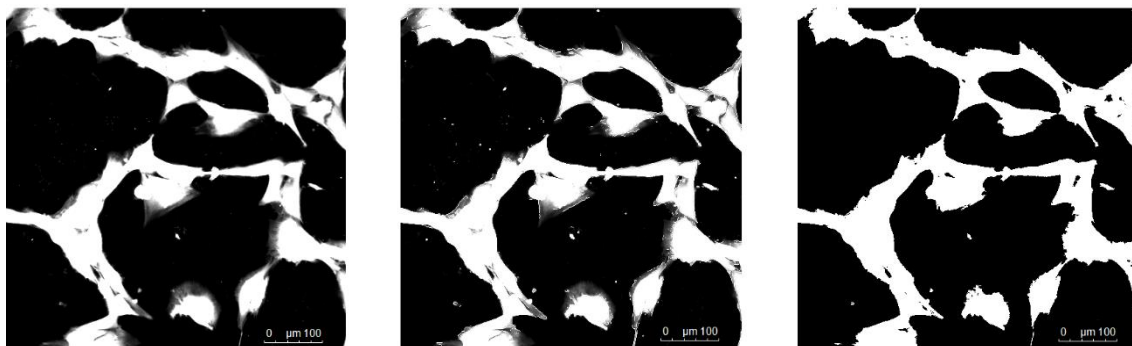


Obrázek 6.4: Schéma programu pro segmentaci prahováním

Načtený soubor je převeden na černobílý se stanoveným prahem. Převod je proveden přes příkaz *im2bw*, kde dochází i k určení prahu. Podle prahu se změní obsah v dané matici na logické hodnoty 1 a 0. Objekty, které jsou zde ohraničené a zároveň jsou uzavřené, musí být vyplněny přes příkaz *bwboundaries*. Takhle je získán černobílý obraz s bílými strukturami. V obraze se ale občas vyskytují velmi malé struktury, které nejsou daným sledovaným vzorkem. Například to může být nějaké smítko, většinou se jedná o velmi malé útvary. Tyto malé útvary lze odstranit pomocí příkazu *bwareaopen*. Díky tomu dojde k odstranění malých struktur, které se nachází kdekoli ve snímku mimo uzavřené objekty. Jelikož i zde došlo k vyhledání bílých pixelů v souboru, výpočet konfluence je u této metody stejný. Celkový počet bílých pixelů je vydělen počtem všech pixelů v matici souboru a následně vynásoben hodnotou sto, k získání procentuální hodnoty.

Pro zhodnocení konfluence bylo nutné určit počet buněk vzhledem k pokrytí

povrchu. Některé fotografie byly počítány ručně, jelikož nebyly obarvená jádra a vzhledem k různým tvarům a velikostem buněk by je nebylo možné spočítat pomocí programu. U buněk, kterým byla jádra obarvena, bylo možné určit jejich počet pomocí vytvořeného programu, jelikož velikost a tvar jader se příliš neliší.

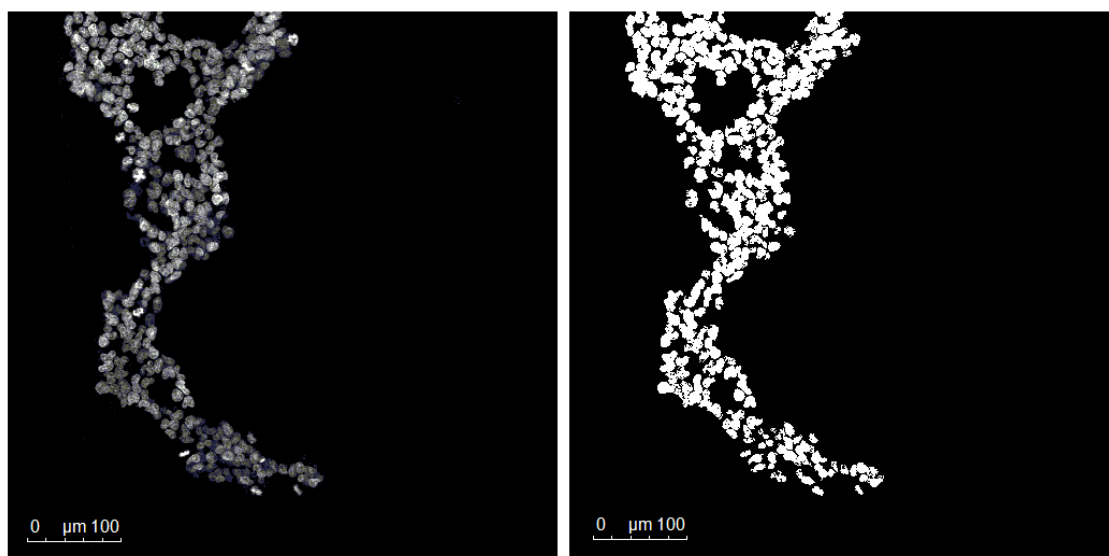


Obrázek 6.5: Fibroblasty, konfokální mikroskop, zvětšení 20x, suma získaných řezů před zpracováním (vlevo), segmentace detekcí hran (uprostřed), segmentace prahováním (vpravo)

Algoritmus začíná přidáním cesty k souborům pomocí příkazu *addpath* a načtením daného obrázku přes *imread*, do jehož příkazu zadáme celý název souboru. Daný snímek se převede na černobílý pomocí příkazu *im2bw*. Výsledkem je snímek s bílými objekty, které představují jádra buněk. Pokud je ve snímku příliš moc jader a navzájem se dotýkají a vytvářejí shluky, jsou rozděleny pomocí příkazu *watershed*. Jednotlivá jádra jsou označkována a na základě toho je vybrán objekt s maximální hodnotou, která značí poslední objekt ve snímku. Tím je získán počet jader ve snímku.



Obrázek 6.6: Schéma detekce počtu jader



Obrázek 6.7: HEK 293 - jádra, konfokální mikroskop, zvětšení 20x, detekce jader

6.6 Výsledky

Pomocí vytvořených programů byly celkově zhodnoceny 4 typy experimentů, které se provedly s adherentními buňkami HEK 293 a fibroblasty. Sady obsahovaly různé počty jednotlivých řezů snímku. Velikost řezů byla 0,3 μm nebo 1 μm a s celkovou tloušťkou snímku 3 μm . Byly zpracovávány dva druhy snímků, jeden obsahoval buňky v celé jejich velikosti, z čehož se počítala konfluence. Další snímky obsahovaly pouze jádra buněk, a sloužily k zjištění počtu buněk.

Při kultivování buněk na skle kultivačních misek či destičkách docházelo při obarvení k odlepení buněk z povrchu. Buňky tedy nebylo možné zdokumentovat a vyhodnotit. Samotné buňky nebo i shluky buněk pluly v kultivační nádobě a sady by obsahovaly řezy, které by si obsahově neodpovídaly. Barvení bylo nutné pro zdokumentování buněk pomocí konfokálního mikroskopu. Špatnou adhezi na povrchu kultivačních nádob (sklo) po obarvení vykazovaly oba druhy buněk, které byly pro experiment použity, a to fibroblasty i embryonální buňky HEK293.

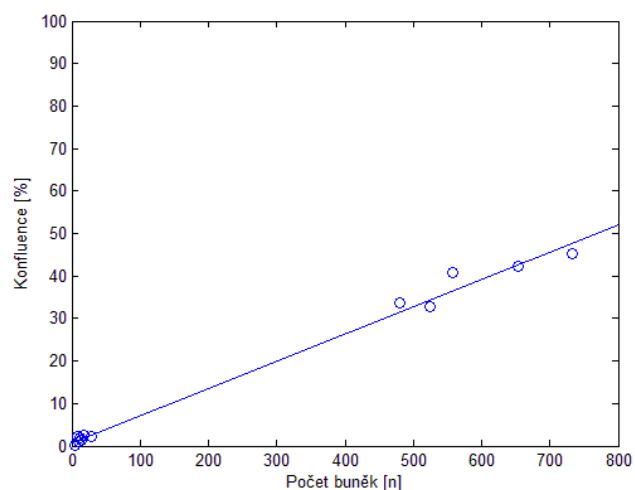
U kultivace fibroblastů na želatině si lze všimnout, že některé nízké konfluency vykazují vyšší počet buněk, než je počet buněk u větších konfluencí. Například snímek s konfluencí 2,21 % obsahuje pouze 9 buněk. Zatímco snímek s nižší konfluencí 1,29 % obsahuje 14 buněk (viz Tabulka 1). Je to dáno zejména velikostmi buněk vzhledem k celkové ploše snímku. Tedy snímek s nižší konfluencí obsahoval buňky větší, než na druhém snímku s vyšší konfluencí.

Podobný jev můžeme vidět i u dalšího experimentu s HEK293 na želatinovém povrchu. I zde se vyskytují nízké konfluency s celkovým počtem buněk větších než u konfluencí s vyšším procentem. Zde je to dáno především tím, že docházelo k překrývání buněk jejich výběžky sloužícími k jejich spojení. K těmto překryvům dochází, pokud jsou buňky více konfluentní. Například snímek s konfluencí 49,10 % obsahuje 1261 buněk, snímek se skoro stejnou jen o málo větší konfluencí 49,30 % obsahuje o 161 buněk méně. Což se může jevit jako docela velký rozdíl. Další snímek s konfluencí 74,72 % obsahuje 1782 buněk. Snímek s konfluencí o 6 % nižší (68,09 %), obsahuje skoro stejný počet buněk 1726 (viz Tabulka 3).

Při kultivaci embryonálních buněk na kultivační misce se našli i úseky se skoro 100% konfluencí, které obsahují přes 2200 buněk (viz Tabulka 4).

Tabulka 1. Konfluency fibroblastů, zvětšení 10x, sklo potáhnuté želatinou

Konfluence 1 [%]	Konfluence 2 [%]	Počet buněk	Konfluence 1 [%]	Konfluence 2 [%]	Počet buněk
2,58	2,32	28	2,75	2,46	17
2,14	1,95	12	34,87	33,80	480
1,55	1,29	14	33,57	32,89	525
0,32	0,26	4	42,95	42,27	654
1,27	1,11	10	45,78	45,13	732
2,31	2,21	9	41,35	40,68	558
1,28	1,07	11			



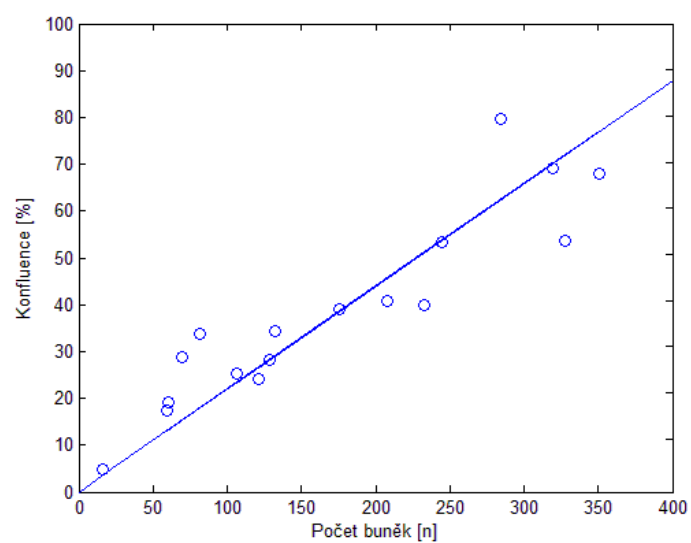
Obrázek 6.8: Graf 1 - Konfluence fibroblastů, zvětšení 10X, želatina

Tabulka 2. Konfluence fibroblastů, zvětšení 20x, sklo potáhnuté želatinou

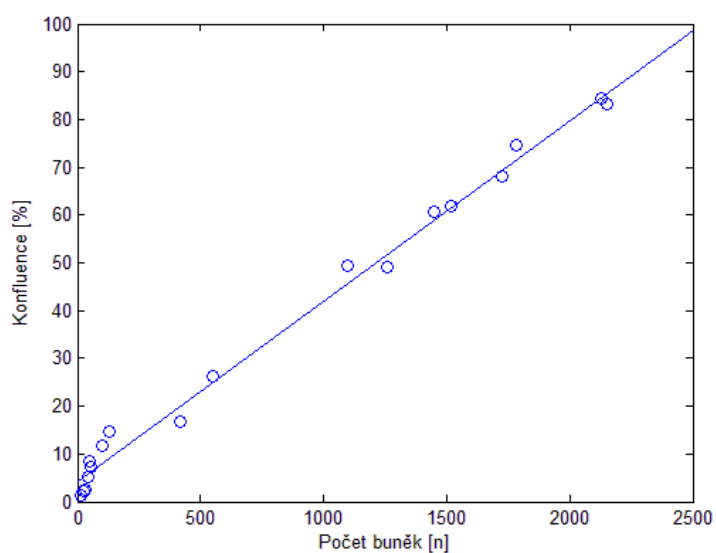
Konfluence 1 [%]	Konfluence 2 [%]	Počet buněk
5,02	4,82	16
54,59	53,34	245
41,90	40,89	208
54,28	53,53	328
29,06	28,27	129
39,98	38,95	176
35,30	34,44	132
26,20	25,41	106
40,52	39,90	233
69,45	68,10	351
24,78	24,08	121
81,07	79,81	284
70,34	69,16	319
28,91	28,72	70
34,06	33,82	82
17,46	17,28	59
19,39	19,19	60

Tabulka 3. Konfluence HEK293, zvětšení 20x, sklo potáhnuté želatinou

Konfluence 1 [%]	Konfluence 2 [%]	Počet buněk
7,66	7,19	57
2,60	2,28	24
2,65	2,52	30
5,60	5,26	42
12,67	11,79	101
15,70	14,59	127
9,20	8,35	51
1,33	1,24	13
62,81	61,90	1515
83,90	83,20	2149
85,33	84,28	2131
61,70	60,66	1447
69,09	68,09	1726
26,86	26,22	552
50,33	49,30	1100
50,08	49,10	1261
76,12	74,72	1782
17,12	16,76	415



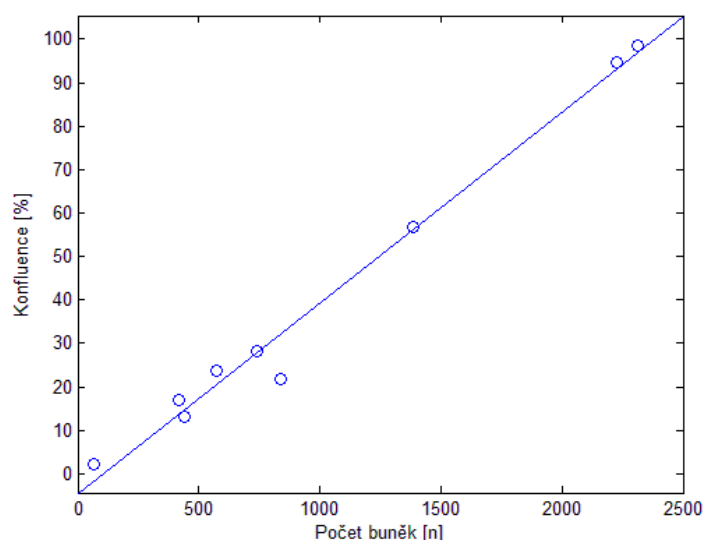
Obrázek 6.9: Graf 2 - Konfluence fibroblastů, zvětšení 20X, želatina



Obrázek 6.10: Graf 3 - Konfluence HEK 293, zvětšení 20X, želatina

Tabulka 4. Konfluence HEK293, zvětšení 20x, konfokální miska

Konfluence 1 [%]	Konfluence 2 [%]	Počet buněk	Konfluence 1 [%]	Konfluence 2 [%]	Počet buněk
22,82	21,69	836	2,69	2,38	66
17,65	17,03	418	99,98	94,82	2225
28,87	28,33	739	58,89	56,64	1388
24,27	23,59	575	99,39	98,52	2311
13,86	13,04	443			



Obrázek 6.11: Graf 4 - Konfluance HEK 293, zvětšení 20X, konfokální miska

Dosažené výsledky značí lineární vztah mezi konfluencí a počtem buněk.

Segmentace prahováním podává pravidelně nižší hodnoty konfluance než druhá metoda. Je to dáno zejména tím, že dojde k odstranění malých struktur, které nejsou brány jako buňky. Tím je celkově snížena konfluance na povrchu. Práh se v metodě nastavuje od 0 do 1. Pro zvětšení 10X je podle empirického zjištění neoptimálnější práh s hodnotou 0,12. Pro zvětšení 20X je nejlepší práh na hodnotě 0,30.

U segmentace detekcí hran nastavujeme sklon hran, opět v rozmezí hodnot od 0 do 1. V programu je zvolena hodnota 0,7 a opět byla zvolena empiricky podle nejlepších výsledků při zkoušení různých hodnot na dané vzorky snímků. Tato hodnota byla použita pro všechna data, která byla získána experimenty. Metoda hranováním podává vyšší hodnoty konfluance než první metoda. Při hranování totiž dochází k rozšíření okrajů objektů a tím dojde ke zvětšení velikosti struktur. Při této metodě nedochází k odstranění malých struktur, což se do konfluance také započítává a tím se její hodnota také zvětšuje. Tato metoda by ale mohla poskytovat pravidelně přibližně podobně stejné výsledky, jako první metoda. Bylo by ale nutné pro každý snímek ladit hodnoty sklonu hran s filtrem. To ale není příliš žádoucí, při experimentech s velkým množstvím snímků to práci velmi prodlužuje. A proto je nejlepší řešení zvolit takové nastavení, které sedí pro většinu dat v sadě.

Většinou se konfluance mezi těmito dvěma metodami liší o 1 %. Největší rozdíl je okolo 5 %, kdy jedna metoda podává 99% konfluenci a druhá 94% konfluenci. Nejmenší rozdíl mezi metodou detekcí prahu a detekcí hran je 0,06 %.

6.7 Diskuze

K vytvoření orgánu, tkání nebo jen jejich částí, je potřeba velké množství životaschopných buněk. Proto je nutné soustředit se na to, co podporuje buněčný růst. To mohou být podmínky (různá teplota, složení vzduchu), dostatek živin a potřebných látek,

a třeba povrchy, které zajistí jejich adhezi (želatina) k povrchu a podpoří jejich růst. Použitelná buněčná vrstva musí být celistvá. Při kultivaci in vitro je tato celistvost hodnocena termínem konfluence, který udává procento pokrytí celého povrchu.

K tomu, aby došlo k velkému množství produkce buněk, ze které by následně mohl vzniknout orgán, je nutné zajistit dlouhodobé přežívání buněk. K získání velkého množství buněk je potřeba hodně času, růst buněk může trvat měsíce.

Kultivace a produkce buněk probíhá tedy mimo tělo, v laboratoři v uměle navozených podmínkách, které se musí striktně dodržovat. Buňky jsou velmi citlivé na změnu podmínek a kontaminaci. Při narušení jejich podmínek či vniknutí cizí částice nebo patogenu k nim dojde k inhibici jejich růstu. Dále je také nutné počítat s tím, že vzniklý orgán či tkáň z uměle kultivovaných buněk, bude muset být přemístěn (z laboratoře na operační sál), a tak je nutné nejen produkovat velké množství buněk, ale i zajistit jejich stabilitu a odolnost. Kultivované buněčné vrstvy by měly obsahovat pouze zdravé buňky. To se pozná podle toho, zdali buňky mají při kultivaci stále stejnou morfologii a jsou homogenní.

Pro hodnocení konfluentnosti vrstvy buněčných struktur existuje mnoho způsobů. K získání přesných hodnot slouží programy, které danou vrstvu dokáží automaticky vyhodnotit. Může být nejen procentuálně určena velikost vzniklé vrstvy oproti pozadí, ale i celkový počet buněk, které vrstvu vytváří. Podstatnější je ale ovšem hodnota konfluence, která postačí ke zjištění stavu kultivované buněčné vrstvy.

V této práci je využita metoda, kde dochází k segmentaci sady snímků a na základě pixelů v matici, je vypočítána konfluence. Za výhodu této metody považují její jednoduchou realizaci a snadné dosažení výsledků. Jako nevýhodu zde vidím v ručním nastavování prahu nebo sklonu hran. V programu jsou přednastaveny hodnoty, které se zdají pro sadu snímků jako neoptimálnější. U některých sad vykazují více přesné výsledky, u jiných zas méně. Pro získání co nejpřesnějších hodnot, je tedy nutno hledat a zkoušet různé hodnoty (prahu, sklonu) pro každou sadu zvlášť. Při analýze velkého množství sad se to může zdát jako určitá nevýhoda.

Konfluence je tedy vrstva buněk, to znamená, že se nemusí určovat pouze procentuální velikost vrstvy oproti okolí, ale můžeme určit přímo počet buněk. Práce se tedy zabývala i získáním počtu buněk ve snímku. Za výhodu tohoto programu považují rychlé získání výsledků (počítání ručně trvá příliš dlouho a je nepřesné, některé snímky obsahují přes 2000 buněk a to se těžko počítá ručně) a rozdělení očividně spojených oblastí a detekci buněk i v této oblasti. Nevýhodou zde je špatná detekce, pokud snímek obsahuje stíny, kde bývá detekce větší a tím i nepřesná.

Výsledky ze všech analyzovaných dat představují lineární vztah mezi konfluencí a počtem buněk. To může být důležitou informací, na základě které lze naplánovat doby očekávané konfluence a následné pasáže.

7 ZÁVĚR

Cílem teoretické části bylo pochopit chování adherentních buněk - endoteliálních buněk, embryonálních buněk a fibroblastů při kultivaci. Dále přehledově shromáždit údaje o jejich výskytu v lidském těle, jejich biologickou podstatu, funkce a vztah k ostatním strukturám či látkám. Na základě získaných poznatků pak provést několik experimentů a provést jejich zhodnocení. Součástí teoretické práce je také popis mikroskopických technik, které se využívají pro sledování adherentních buněk.

Byla provedena řada experimentů s endoteliálními buňkami HUVEC, embryonálními buňkami HEK293 a fibroblasty. Konfluence (relativní plošnou hustotu buněk, tj. jakou část dna kultivační misky buňky v daném čase pokrývají) byla snímána a kvantifikována u embryonálních buněk HEK293 a fibroblastů při třech různých podmínkách. Základním povrchem pro kultivaci bylo sklo. Tento experiment se nepovedlo zdokumentovat konfokálním mikroskopem, jelikož po obarvení buněk docházelo k jejich deadherenci ze dna kultivačních misek. K zajištění adherence byly použity povrchy želatina a polystyren. Práci s těmito povrchy bylo možné skenovat pomocí konfokálního mikroskopu. Určování konfluence a počtu buněk bylo ztíženo tím, že buňky překrývaly svými výběžky ostatní buňky v místech s vyšší konfluencí. U fibroblastů navíc konfluenci ovlivňuje i různá velikost jednotlivých buněk.

Práce tedy splnila kultivaci adherentních buněk v různých podmínkách a jejich zdokumentování. Dlouhodobé přežívání buněk se nepodařilo vždy zajistit. Při kultivaci buněk došlo k jejich kontaminaci a následně k inhibici růstu. Dalším problémem byla nedostatečná zkušenost práce s kultivací buněk a pomalý postup při kultivaci, který na buňky působil negativně. Před skenováním konfokálním mikroskopem bylo nutné buňky obarvit fluorescenčním barvivem. Použitá koncentrace fluorescenčního barviva ale způsobila nečekaně změnu tvaru buněk, reakce buněk na dané barvivo byla překvapující, neboť v předchozích analýzách v naší laboratoři si obvykle buňky zachovaly morfologii i několik hodin po obarvení. Buněčnou kulturu tedy nebylo možné dobře skenovat a ani pokračovat v její kultivaci.

Pro zhodnocení konfluence byl vytvořen program v prostředí MATLAB, který dokáže načíst sadu snímků daných buněk z mikroskopu, jednotlivé řezy následně sumarizuje do jednoho obrázku. Takový snímek je potom převeden segmentací na černobílý. Program využívá dvě metody segmentace – prahování a hranování. Konfluence je následně vypočítaná podle počtu bílých a černých pixelů. Další součástí programu je zjištění počtu buněk metodou detekce jader.

Závěrem, který plyne z experimentů a jejich výsledků promítlých do grafů, lze říci, že konfluentnost vrstvy je poměrně lineárně závislá na počtu buněk.

LITERATURA

- [1] DEJANA, Elisabetta. *Endothelial cell–cell junctions: happy together*. Nature reviews Molecular cell biology, 2004, 5.4: 261-270.
- [2] MUDr. David Karásek Ph.D., prof. MUDr. Helena Vaverková CSc. *ENDOTELIÁLNÍ DYSFUNKCE, ENDOTELIÁLNÍ DYSFUNKCE, MOŽNOSTI JEJÍ DETEKCE OŽNOSTI JEJÍ DETEKCE A VYUŽITÍ V KLINICKÉ PRAXI. INTERNÍ MEDICÍNA PRO PRAXI*, 2004, 9.
- [3] MASOPUST, Jaroslav, et al. *Patobiochemie buňky*. 1. vydání. Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, 2003. 344 s. s. 88–92. ISBN 80-239-1011-6.
- [4] KUPCOVÁ SKALNÍKOVÁ, Helena. Extracelulární váčky I. Typy váčků a jejich fyziologické úlohy v mezibuněčné komunikaci. *Živa*. 2016, (6), S. 274.
- [5] VESELÝ, Jaroslav. *Fyziologie endotelu, dysfunkce endotelu*. In: Pfyziollfup.upol [online]. Ústav patologické fyziologie LF UP v Olomouci: wiki, 2012 [cit. 2016-11-23]. Dostupné z: <http://pfyziollfup.upol.cz/castwiki2/?p=1456>
- [6] ROKYTA, Richard. *Fyziologie a patologická fyziologie: pro klinickou praxi*. Praha: Grada Publishing, 2015. ISBN 978-80-247-4867-2.: 159.
- [7] ČEDÍKOVÁ, M., K. KRÁKOROVÁ, M. MIKLÍKOVÁ, M. HRONOVÁ, A. BALANDOVÁ, P. PITULE a M. KRÁLÍČKOVÁ. *On-line atlas různých typů kmenových buněk a vybraných diferenciacních postupů* [online]. Plzeň, 2012. Dostupné také z: https://www.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/On-line_atlas_kmenovych_bunek.pdf S.11-13
- [8] Kmenove bunky, jejich vlastnosti a zakladni cleneni [online]. 8. Dostupné z: <http://www.bunecnaterapie.cz/miranda2/export/sitesavcr/data.avcr.cz/lifesci/bunecnaterapie/sys/pdf/kmenove-bunky-vlastnosti-zakladni-cleneni-2.pdf>
- [9] GOLDSTEIN, Lawrence S. B. a Meg F. SCHNEIDER. *Stem cells for dummies*. Hoboken, N.J.: Wiley Publishing, c2010. --For dummies. ISBN 978-0-470-25928-3. S. 53-65
- [10] JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchôa, José CARNEIRO a Robert O. KELLEY. *Základy histologie*. Jinočany: H & H, 1997. ISBN 80-85787-37-7.
- [11] ALBERTS, Bruce, et al. *Fibroblasts and their transformations: The connective-tissue cell family*. 2002.
- [12] KOČÁREK, E., M. PÁNEK a D. NOVOTNÁ. *Klinická cytogenetika I: Úvod do klinické cytogenetiky, vyšetřovací metody v cytogenetice*. 1. vydání. Karolinum, 23006. ISBN 80-246-1069-8.
- [13] *Kultivace buněk a tkání* [online]. leporelo: leporelo [cit. 2016-11-23]. Dostupné z: <https://leporelo.info/kultivace-bunek-a-tkani>
- [14] VEJRAŽKA, Martin. *Buněčné kultury* [online]. In: Ústav lékařské biochemie, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze, s. 24 [cit. 2016-11-23]. Dostupné z: <http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze->

prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf

- [15] *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology; revised edition*. Příprava vydání R. Cammack et al. New York: Oxford university press, 2006. ISBN 0-19-852917-1.
- [16] ZOU, Tao, et al. *Neutral coatings for the study of polycation/multicharged anion interactions by capillary electrophoresis: application to dendrigraft poly-l-lysines with negatively multicharged molecules*. Analytical chemistry, 2010, 82.17: 7362-7368.
- [17] *Hages-zelatina* [online]. hages. Dostupné také z: <https://www.hages.cz/katalogy/zelatina.pdf>
- [18] *Gelatin from porcine skin* [online]. Dostupné také z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g1890?lang=en&ion=CZ>
- [19] Clonetics™ Endothelial Cell System Technical Information & Instructions. Lonza [online]. , 15
- [20] BARADEZ, Marc-Olivier a Damian MARSHALL. *The Use of Multidimensional Image-Based Analysis to Accurately Monitor Cell Growth in 3D Bioreactor Culture* [online]. PLoS ONE, 2011
- [21] SENTHILKUMARAN, N. a R. RAJESH. Edge Detection Techniques for Image Segmentation – A Survey of Soft Computing Approaches. *International Journal of Recent Trends in Engineering*, [online]. 2009, (2), 5.
- [22] Introduction to Fluorescence Microscopy. In: *Microscopyu* [online]. Melville, New York: NIKON INSTRUMENTS, 2016. Dostupné z: <https://www.microscopyu.com/techniques/fluorescence/introduction-to-fluorescence-microscopy>
- [23] HRAZDIRA, Ivo a Vojtěch MORNSTEIN. *Lékařská biofyzika a přístrojová technika*. 1. vydání. Brno: Neptun, 2001. ISBN 80-902896-1-4.
- [24] Superrozlišovací optická mikroskopie pro studium nanostruktur. In: *Gate2biotech* [online]. České Budějovice: CREOS, 2013. Dostupné z: <http://www.gate2biotech.cz/superrozlisovaci-opticka-mikroskopie-pro-studium-nanostruktur/>
- [25] LAKOWICZ, Joseph R. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. New York: Springer, c2006. ISBN 978-0387-31278-1. S. 63-80, 675-676
- [26] BECKER, Wolfgang; BERGMANN, Axel. Lifetime imaging techniques for optical microscopy. *Tech-nical report, Becker & Hickl GmbH*, 2003.
- [27] TAATJES, Douglas J.; ROTH, Jürgen. *Cell Imaging Techniques; Methods and Protocols*. 2. vyd. [s.l.] : Humana Press, 2013. (Methods in Molecular Biology).
- [28] DAVIDSON, M.W.; ABRAMOWITZ, M. Optical Microscopy. In HORNAK, J. *Encyclopedia of Imaging Science and Technology*. New York: Wiley-Interscience, 2002. Dostupné online. S. 1106-1141.
- [29] Fluorescenční mikroskopie. *natur.cuni* [online]. Dostupné z: <http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/mikro/mscope/fluor/fluor.htm>
- [30] MURPHY, Douglas B. *Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging*.

- [s.l.] : John Wiley & Sons, 2001.
- [31] LICHTMAN, J. W.; CONCHELLO, J. A.. Fluorescence microscopy. *Nat Methods*.. 2005, roč. 2, čís. 12, s. 910-9. ISSN 1548-7091.
- [32] Fluoromicroanatomy. In: *Olympusmicr* [online]. Olympus America, 2012. Dostupné z: <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/fluorescence/anatomy/fluoromicroanatomy.html>
- [33] NWANESHIUDU, Adaobi, et al. Introduction to confocal microscopy. *The Journal of investigative dermatology*, 2012, 132.12: e3. S. 1-2
- [34] WRIGHT, Shirley J.; WRIGHT, David J. Introduction to confocal microscopy. *Cell Biological Applications of Confocal Microscopy, in Methods in Cell Biology*, 2002, 70: 1-85.
- [35] Fluoromicroanatomy. In: *Olympusmicr* [online]. Olympus America, 2012. Dostupné z: <http://www.olympusmicro.com/primer/techniques/confocal/confocalintro.html>